UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1935-1936 No 158

INFLUENCE DE CERTAINS EXTRAITS CRYPTOGAMIQUES SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 26 Novembre 1936 à la
FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université

par

MARIE-JEANNE MERGLEN
Pharmacien

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. A. SARTORY, *Doyen*, Président
Y. VOLMAR, *Professeur*
R. SARTORY, *Chargé des fonctions d'Agrégé* } Juges

1936
IMPRIMERIE A. WEIBEL
STRASBOURG
1 RUE DU PARCHEMIN, 1

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548005_0015

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1935-1936 No 158

INFLUENCE DE CERTAINS EXTRAITS CRYPTOGAMIQUES SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 26 Novembre 1936 à la
FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université

par

MARIE-JEANNE MERGLEN
Pharmacien

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. A. SARTORY, *Doyen*, Président
Y. VOLMAR, *Professeur*
R. SARTORY, *Chargé des fonctions d'Agrégé* } Juges

1936
IMPRIMERIE A. WEIBEL
STRASBOURG
1 RUE DU PARCHEMIN 1

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C ✻, I. ✿, C. ❁
VOLMAR, *Assesseur*
CUVIER, *Secrétaire* A. ✿

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁

PROFESSEURS

MM. A. SARTORY, C. ✻, I. ✿, C. ❁ .. Bactériologie
LAVIALLE, I. ✿, ❁ ..... Botanique
VOLMAR, I. ✿ ..... Chimie organique
GUILLAUME, ✻, ⚕, I. ✿, ❁ .... Pharmacie galénique
LAPP, I. ✿ ..... Chimie analytique
(CORDIER, chargé du cours) ✿ .. Pharmacie chimique
(R. SARTORY, chargé du cours) ✿ Matière médicale

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁.

CHARGE DES FONCTIONS D'AGREGE

M. R. SARTORY, ❁.

COURS COMPLEMENTAIRES

MM. A. SARTORY ..... Hygiène
LAVIALLE ..... Hydrologie
VOLMAR ..... Chimie minérale
GUILLAUME ..... Zoologie
LAPP ..... Physique
EISENMANN ..... Législation et Déontologie
CORDIER ..... Chimie biologique
R. SARTORY ..... Cryptogamie
DUQUENOIS ..... Toxicologie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. R. SARTORY ..... Bactériologie et Parasitologie
COLLARD, I. ✿, ⚕ ..... Chimie pharmaceutique
BOHN, A. ✿ ..... Histoire naturelle
DUQUENOIS ..... Chimie et Physique

A MES PARENTS

A MA TANTE

Témoignage d'affectueuse reconnaissance.

A MES FRERES

Témoignage de vive affection.

A CEUX QUI ME SONT CHERS

Au Président du Jury de ma Thèse

Monsieur A. SARTORY

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Commandeur de la Légion d'Honneur

A mes Juges

Monsieur Y. VOLMAR

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur R. SARTORY

Chargé des fonctions d'Agrégé à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de respectueuse et profonde gratitude.

INTRODUCTION

Que l'on considère la flore ou la faune, partout un fait capital et général nous apparaît: c'est l'évolution, c'est-à-dire la croissance de chaque être.

L'évolution de tout organisme est subordonnée à sa nutrition. Mais bientôt on a pu constater que le maintien de la vie de l'être et sa croissance ne dépendent pas uniquement des matières alimentaires ordinaires (protéines, hydrates de carbone, sels minéraux, eau, etc.) mais qu'ils peuvent être modifiés par l'apport de corps, qui, pour n'être pas vraiment alimentaires, n'en ont pas moins une certaine influence.

C'est Pasteur, qui posa pour la première fois la question de facteurs favorisant la croissance. Il établit que, dans une culture de levure il se produisait une fermentation nettement plus active si, au lieu d'NH^3 pour aliment azoté, on se servait de sucs de fruits.

Les travaux mémorables de Hopkins, Aron, Osborne, Abderhalden etc. mais surtout l'avènement des vitamines ont amené des lumières sur la question. La plupart des auteurs jusqu'alors s'étaient inspirés dans leurs recherches des conceptions qui ont gouverné la physiologie. La bactériologie n'est pas restée en dehors de ce mouvement révolutionnaire causé par les vitamines. De bonne heure elle s'était aperçue

que certaines bactéries poussaient bien sur certains milieux alors que d'autres pas. Elle se rendit compte que ce fait présentait une analogie avec des phénomènes relevant de la physiologie des animaux supérieurs et dont l'étude avait conduit à la notion de vitamines. Ainsi on ne tarda pas à parler de vitamines pour les bactéries comme on parlait de vitamines pour les animaux.

Cette assimilation est cependant discutée et a soulevé de nombreux problèmes. Bon nombre de substances favorisantes, actives à faibles doses sur la croissance des microorganismes, ne répondent pas exactement aux caractères attribués aux vitamines. Bien des chercheurs se sont demandé si les végétaux et surtout les monocellulaires avaient vraiment besoin de tels composés pour mener à bien leur évolution. Les avis sont partagés et la question reste nébuleuse. Toutefois on peut affirmer que si ces corps ne sont pas indispensables à la vie des bactéries ils sont singulièrement efficaces quant à leur prolifération.

On conçoit aisément l'intérêt que présente la découverte de tels facteurs non seulement au point de vue théorique mais aussi pratique si nous pensons à la possibilité d'un diagnostic précoce, à la préparation de vaccins thérapeutiques. Il est déplorable en effet, que le diagnostic bactériologique qui est pourtant de la plus haute importance dans certaines maladies, arrive en raison de sa lenteur d'expérimentation tard, souvent même trop tard.

Dans cet ordre d'idées nous avons entrepris notre travail: trouver des substances pour activer la croissance des bactéries, rechercher des moyens nouveaux pour sélectionner une bactérie pathogène des microbes saprophytes, permettre l'isolement des agents actifs d'infections mixtes.

Nos recherches ont donc pour but d'étudier l'influence de certains extraits cryptogamiques sur la croissance des bactéries. Elles comportent deux parties:

Dans la première partie nous donnons l'historique de la question. La mise au point en est relativement difficile en raison de la nature tout à fait disparate des recherches entreprises à ce sujet. Aussi l'avons-nous divisé pour l'éclaircir en 3 chapitres: Influence des levures, influence des extraits bactériens, influence de filtrats de champignons inférieurs.

La deuxième partie comprend l'exposé de nos travaux personnels. Nous indiquons la préparation des filtrats, les techniques et les méthodes de mesure de la croissance. Des tableaux résument avec clarté les résultats de nos recherches. Des considérations générales qui semblent se dégager de l'ensemble de nos expériences terminent le travail.

Nous tenons à exprimer ici toute notre gratitude à Monsieur le Professeur A. Sartory, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui a bien voulu nous confier la mise au point de ce sujet. L'intérêt constant qu'il nous a témoigné au cours de ce travail, sa grande expérience nous ont beaucoup facilité la tâche. Nous l'assurons de toute notre vive reconnaissance.

Nous adressons également l'expression de notre respect et de notre gratitude à Monsieur le Professeur Volmar, ainsi qu'à Monsieur R. Sartory, chargé des fonctions d'Agrégé qui ont accepté tous deux de faire partie du Jury de la thèse.

Notre reconnaissance et nos vifs remerciements à Monsieur J. Meyer, assistant à la Faculté, qui nous a guidé dans nos recherches avec la plus grande amabilité et dont les conseils avisés nous furent d'une aide précieuse.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

Chapitre premier

INFLUENCE DES EXTRAITS DE LEVURE SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES.

Un très grand nombre de travaux ont été consacrés à l'étude de facteurs de croissance existant dans les levures et les premières recherches remontent déjà assez loin. Malheureusement il y a peu d'accord entre les chercheurs. Partant de produits différents (levure de brasserie, levure de boulangerie) utilisant des techniques disparates (décoctions, autolysats), ils arrivent souvent à des résultats qui ne sont pas superposables.

Dès 1890 Beyerinck (1) observe que les bactéries lactiques se développent bien sur un milieu de culture composé d'eau de levure, de glucose et de gélose.

Spronck en 1898 (2) indique qu'un milieu à la levure est très favorable à la culture du Bacille diphtérique et donne les avantages suivants d'un tel milieu:

1) le Bacille diphtérique pousse rapidement et abondamment;
2) le Bacille diphtérique produit dans la décoction de levure une toxine beaucoup plus forte que dans le bouillon de viande;
3) le milieu reste alcalin et la production de la toxine est rapide et régulière;
4) bon marché;
5) suppression de l'emploi d'une viande conservée jusqu'à putréfaction.

Ces conclusions sont confirmées par Nobécourt (3) en 1900 qui étudie l'action de 3 échantillons de levure: Saccharomyces cerevisiae, une levure haute et une levure ne produisant pas d'ascospores isolée d'un pain de levure de boulanger. Il montre qu'en ensemençant simultanément ces levures et des bactéries, le Colibacille, le Streptocoque, le Proteus, le Bacille pyocyanique, le Staphylocoque doré, le Bacille typhique, le Vibrion cholérique se développent normalement, par contre le Bacille de Lœffler pousse généralement plus mal que sur les tubes témoins.

Si au lieu d'ensemencer les bactéries sur les cultures de levures vivantes on les ensemence sur celles-ci après filtration sur bougie, on constate que les bactéries qui se développaient mal sur les premières poussent mieux sur les secondes.

Il lui semble que l'action nuisible des levures résulte principalement d'une action vitale de la part du végétal.

Ses recherches montrent que souvent les levures ont une influence marquée sur les microbes, mais que cette influence varie singulièrement avec les espèces mises en présence.

La décoction de levure est recommandée par G. Bertrand en 1904 (4) pour la culture de la bactérie du sorbose. La bactérie se développe très vite. L'auteur ajoute que toutes les levures ne se prêtent toutefois pas au développement de la bactérie.

Mais les milieux de culture à base de levure n'ont eu leur véritable raison d'être que durant la grande guerre. Alors qu'on disposait à peine d'assez de viande pour la population, on se trouva dans la nécessité de pourvoir à un autre produit que l'extrait de viande pour la confection de milieux de culture. La levure, ayant fourni de bons résultats, obtint alors un grand succès au laboratoire bactériologique, surtout en Allemagne. Nous tenons à ne citer ici que les travaux de Fischer, Bitter, Wagner (5) et Kressler (6).

Gassner en 1917 (7) indique que le bouillon de levure est aussi favorable à la culture des Bacilles typhiques, Colibacille,

Staphylocoques, Streptocoques, Vibrions cholériques, que le bouillon de viande.

L'action des autolysats de levure, obtenus par un séjour de 24 heures à 48-49° fut étudiée par Vansteenberg (8) sur la culture des bactéries lactiques. Il constate ce fait important qu'au-dessus d'une concentration optima ces autolysats ne sont plus favorables, mais au contraire nuisent à la culture. L'autolysat doit être dilué pour agir de la meilleure façon.

Kliger (9) a pu en 1919 cultiver sur de la levure autolysée les bactéries suivantes: Bacille dysentérique, Bacille diphtérique, Streptocoque, Staphylocoque, Bacille du colon et Bacille tuberculeux. Sur ce milieu les bacilles tuberculeux provenant d'une culture sur bouillon de viande glycériné, commencent à se développer au bout de 4 à 5 jours, à la température de 37 à 38°. La moyenne de pesées a donné avec le nouveau milieu 0,496 de corps microbiens pour 100 gr. de liquide, alors qu'on note en général un poids voisin de 0,500 gr. pour la même quantité de culture sur bouillon de viande glycériné. Il est à remarquer que ces premiers résultats concernent une culture de première génération, de ce fait, paraissent encourageants. L'accoutumance permettra sans doute d'obtenir des cultures encore plus rapides et plus abondantes.

S'appuyant sur les travaux de Vansteenberg, Dienert et Guillerd (10) utilisent des autolysats de levure pour la culture du Bacille du colon. Ils se servent de bouillon fabriqué avec les produits de l'autolyse de 24 heures d'un bloc de 500 gr. de levure pressée porté à 50°. En moins de 24 heures la liquéfaction est complète et l'on obtient environ 400 cc de liquide autolysé qu'on étend à 2 litres avec de l'eau. On soumet ce mélange à la température de l'ébullition durant 30 minutes. On neutralise, on filtre et on complète à 7 litres 500. La levure autolysée donne un milieu de composition très constante (1,8 d'acides aminés exprimés en glycocolle % de liquide d'autolyse et 0 g 150 % de tryptophane).

Ce milieu, d'un faible prix de revient, donne des résultats supérieurs à ceux des bouillons peptonés.

L'addition d'un extrait de levure prolongerait de plus d'un mois, selon Eberson (11) la vitalité du Méningocoque dans une culture. Son milieu est composé de peptone, de phosphate de potassium, de gélose. La levure subit d'abord 2 extractions de 2 heures à une température ne dépassant pas 100°. Le milieu additionné de l'extrait est stérilisé à 115° pendant une demi-heure.

En 1920 Jötten (12) recommande la levure de bière comme milieu de culture propre à la culture du Bacille typhique et du Vibrion cholérique et s'en sert pour le diagnostic de ces maladies.

Ayers et Rupp (13) décrivent la même année un milieu de culture pour Streptocoques préparé avec un extrait sec de levure. Cet extrait ne serait toutefois pas préférable à un extrait de levure fraîche.

Morini (14) cultive le Gonocoque sur un milieu à la levure de bière.

Thjötta et Avery (15) retrouvent en 1920-1921 dans la levure une substance qu'ils avaient déjà découverte dans le sang et qu'ils avaient appelée facteur V. Cette substance thermolabile, associée à une autre substance thermostabile favorise remarquablement la culture de certaines bactéries pathogènes.

Sazerac (16) obtient de belles cultures de Bacilles tuberculeux humains et de Bacilles tuberculeux bovins sur un milieu contenant de la levure autolysée, renfermant des acides aminés de nature variée:

100 gr. de levure de boulangerie sont abandonnés à l'autodigestion pendant 48 heures, à la température de 47 à 48°. Au bout de ce temps, la masse demi-liquide obtenue est agitée avec un litre d'eau de source. On filtre, on ajoute 5% de NaCl, on alcalinise nettement, on ajoute 4% de glycérine. On chauffe dans la vapeur fluente pendant 30 minutes, on filtre, on stérilise 15 minutes à 115°.

100 gr. de produit d'autolyse renferment 2,12 d'acides aminés et 0,18 de tryptophane.

En raison du prix de revient élevé des milieux de culture préparés avec de la viande de boucherie et des peptones, Abt et Blanc (17) ont cherché à employer, d'une part pour entretenir leur collection de microbes, d'autre part pour cultiver un bacille du groupe paratyphique, des milieux à la levure de bière autolysée analogues à ceux étudiés par Dienert pour le Colibacille, par Sazerac pour le Bacille tuberculeux.

Ces milieux étaient préparés de la manière suivante: la levure de brasserie est lavée à plusieurs reprises par décantation et essorée. On détermine rapidement sur une petite portion le poids sec. On délaye dans l'eau salée à 9‰ de manière à avoir une dilution de 8 à 10% et l'on maintient pendant 24 à 36 heures à la température de 48-50° en couche peu profonde dans des vases larges. On ajoute ensuite 2 volumes d'eau, on chauffe à ébullition et on filtre pour séparer la levure non solubilisée. Puis on neutralise à la soude jusqu'au voisinage de la réaction alcaline à la phtaléine, on stérilise 15 min. à 115° et on filtre. On évapore à sec 10 cmc du liquide filtré pour connaître l'extrait sec, puis on dilue de manière à avoir des bouillons à 2% à 1% et même à 0,5%. Ces bouillons peuvent être gélosés.

Les cultures obtenues sur de tels milieux sont riches pour typhique, paratyphique, Bacilleles espèces suivantes: Bacille de Flexner, Charbon, Bacille pyocyanique, Streptocoques, Pneumobacille, Vibrions cholériques. Au bout de 3 mois ces cultures sont parfaitement vivantes.

Partant de la levure de bière, Funk et Dubin (18) en 1921 sont parvenus à séparer de la vitamine B par adsorption de celle-ci sur de la terre à foulon une substance qu'ils désignent provisoirement sous le nom de vitamine D et qui agirait sur la croissance du Streptocoque.

Kister (19) prépare un milieu de culture à base de levure de bière et affirme qu'un tel milieu peut rivaliser avec le

bouillon de viande. Il recommande ce milieu spécialement pour la culture de Vibrions cholériques.

Jimenez (20) Standflüss, Kallert tirent de même de la levure, un extrait contenant des facteurs favorisant la culture des bactéries.

En 1922 Freedmann et Funk (21) font des expériences sur les principes qui, dans la levure autolysée, favorisent la culture du Streptocoque. Un autolysat de levure est filtré, puis agité pendant 3 heures avec de la terre à foulon ajoutée dans la proportion de 50 gr. par litre. Après filtration le liquide n'a rien perdu de ses facteurs favorisants pour le Streptocoque. Mais une nouvelle extraction fractionnée avec 100 gr. de terre à foulon par litre enlève les facteurs. On peut récupérer ces facteurs favorisants en traitant la terre à foulon par une solution de baryte à 10% ajoutée dans la proportion d'un volume 1/2 et agitée avec la terre à foulon à la température de 60° pendant 2 à 3 minutes. Après filtration et lavage du dépôt, le filtrat est neutralisé avec une solution d'acide sulfurique à 20%. Après enlèvement du sulfate de baryum, le filtrat est ramené au volume primitif du liquide au pH 7,4 et stérilisé. Les extraits ainsi obtenus de la première et de la deuxième extraction ont conservé les facteurs favorisant la culture du Streptocoque.

A la même époque, Thilo et Kurt (22) opèrent la peptonisation de la levure à l'autoclave et préparent des milieux gélosés à l'aide du produit obtenu. La semence bactérienne y pousse régulièrement bien.

En 1923 Lichtenstein (23) préconise l'emploi de milieux de culture à base de levure de bière surtout pour les bactéries dont la culture est difficile. Il attire l'attention sur le fait que toutes les levures ne présentent pas toujours les mêmes qualités.

Murray (24) se sert de levure autolysée pour la culture de Bactéries nitrifiantes.

De ses expériences sur les vitamines, Wyon (25) conclut que la vitamine B ne favorise pas la croissance des bactéries, elle est donc dissemblable du facteur qui stimule la croissance des bactéries.

Nao Uyei (26) en 1927 émet l'opinion que la vitamine B isolée des levures ou du jus de citron exerce une action stimulante très prononcée sur la multiplication des Bacilles tuberculeux.

En 1929 Nell, James, Sugg, Richardson, Lurline (27) recommandent le milieu de culture à base de levure, mais font une restriction dans l'emploi d'un tel milieu pour la culture de certaines bactéries qui y déterminent une forte acidité, qui ne nuirait cependant pas à la plupart des expériences.

Plus récemment (1934) Wyss, Chodat (28) dans leur étude sur la culture du Gonocoque indiquent qu'un milieu à base de levure de boulangerie surpasse à tout point de vue le liquide d'ascite. La culture du gonocoque est déjà très florissante 12 à 18 heures après l'ensemencement et permet l'obtention rapide d'auto-vaccins actifs.

Nous terminons l'exposé de ce chapitre en donnant la préparation de l'eau de levure d'après Duclaux (29).

On prend de la levure de brasserie et non des levures de commerce souvent additionnées de fécule et qui, en raison de ce fait, ne donnent pas de décoctions limpides. On met cette levure en suspension dans l'eau et la passe à travers un tamis de soie à mailles serrées pour la débarrasser de ses plus grosses impuretés. On laisse reposer quelques minutes le liquide tamisé, on le décante ensuite pour le séparer des poussières fines plus lourdes qui ont traversé le tamis et on l'abandonne pendant 24 heures à lui-même. La levure se sépare, laissant au-dessus d'elle un liquide de lavage trouble, qu'on jette. On délaye le dépôt dans l'eau à raison de 40 à 50 gr. de levure humide par litre et on fait bouillir en agitant constamment avec une spatule. Quand le liquide bout, on le jette sur un

filtre. La décoction est limpide quand la levure est fraîche. Quand elle est un peu louche, on réussit d'ordinaire à l'éclaircir en y déterminant un léger précipité de phosphate de chaux, au moyen de quelques gouttes d'une solution d'acide phosphorique qu'on sature ensuite avec de l'eau de chaux. La liqueur ainsi traitée devient neutre, tandis qu'elle est légèrement acide quand elle provient d'une simple décoction.

Chapitre II

INFLUENCE DES EXTRAITS DE BACTERIES SUR LEUR PROPRE CROISSANCE.

De même que les résultats obtenus dans l'étude des extraits de levures sur la croissance des bactéries manquent de cohésion, les résultats des recherches relatives aux facteurs de croissance extraits de bactéries n'ont pas connu l'avis unanime des chercheurs.

Les bactéries, en tant que végétaux inférieurs, semblent capables de réaliser la synthèse de facteurs de croissance analogues aux vitamines.

Les expériences de Pacini et Russel (30) nous fournissent un exemple de telle synthèse. Ces auteurs, ayant remarqué que des reconvalescents de la fièvre typhoïde montrent souvent une recrudescence de croissance notable, ont fait développer des Bacilles typhiques sur simple milieu Uschinsky, dépourvu de vitamines. A partir du milieu et des bactéries qui avaient poussé sur ce terrain ils ont préparé des extraits alcooliques acides et ont examiné l'influence de leurs vitamines en expérimentant sur des rats. Ainsi ils ont pu prouver la présence de vitamines dans le corps de Bactéries typhiques.

En 1897 Grassberger (31) observe un renforcement des colonies de Bacilles de Pfeiffer qui poussent sur gélose au voisinage de colonies de Staphylocoques. Il appelle «colonies géantes» ces colonies qui sont stimulées par la présence de bactéries d'espèces différentes. S'il ajoute au milieu neuf une culture de Staphylocoque doré chauffé à la vapeur fluente pendant 15 minutes, le phénomène se produit, mais non régu-

lièrement. L'auteur conclut que le facteur de croissance figurant dans les Staphylocoques n'est pas modifié par un chauffage à 100° ne dépassant pas 15 minutes.

Selon Cantani (32) on arrive à faire pousser le Bacille de Pfeiffer sur des milieux qui lui sont impropres en déposant sur ces milieux des bactéries tuées.

Ghon et Preysz en 1902 (33) obtiennent sur gélose ordinaire une riche culture de Bacille de Pfeiffer quand ils y ajoutent des bactéries mortes.

Neisser (34) confirme en partie les travaux précédents. Il obtient des cultures du même bacille en ensemençant en même temps que lui d'autres espèces de bactéries qui jouent le rôle de «bactéries nourrices» (Ammenkeime).

D'après Knorr (35) ces bactéries associées n'agiraient favorablement que dans les milieux totalement dépourvus de facteurs de croissance. Dans des milieux qui, au contraire, en sont porteurs, les germes associés non seulement deviennent inutiles, mais peuvent même devenir nuisibles.

Partant du même point de vue, Kollath (36) prétend qu'un milieu de culture auquel les germes associés n'ajoutent aucune qualité doit être considéré comme un milieu optimum.

Lorsque les bactéries associées sont cause d'un amoindrissement au lieu d'une amélioration du milieu de culture on voit se former autour des colonies de germes associés, des zones d'empêchement où le Bacille de Pfeiffer ne pousse pas. On peut expliquer ce phénomène ainsi: les bactéries associées ont pu produire un léger excès d'acide ou d'alcali qui à pu être néfaste si le Bacille de Pfeiffer était auparavant à la limite de la tolérance. Ou bien, les bactéries ont pu secréter des ferments peptonisants qui ont lésé la substance nutritive proprement dite.

Poursuivant ses recherches, l'auteur montre que l'action des colonies associées est augmentée par l'addition d'une

suspension de Bacilles de Friedlænder. L'addition de glucose la favorise aussi, mais celui-ci ne facilite la culture que parce qu'il est facilement assimilable.

Dans des travaux plus récents Kollath vérifie le fait connu que le Bacille de Pfeiffer ne pousse pas sur des milieux ordinaires qu'il appelle «milieux de famine». Mais il observe qu'au commencement de la strie d'ensemencement et aussi en d'autres points, de petites colonies discrètes se forment dont la croissance s'arrête vite d'ailleurs, après l'apparition de formes de dégénérescence. Certains auteurs considèrent ces petits amas comme formés par la semence elle-même. Kollath pense au contraire qu'il s'agit d'une vraie culture développée par les Bacilles de Pfeiffer aux dépens des cadavres de bactéries que contenait la semence apportée. Il emploie pour désigner cette espèce de symbiose des bactéries le terme de «cannibalisme».

En 1904 Luerssen (37) arrive à activer la culture du Bacille de Pfeiffer en mêlant à la gélose du Bacille Prodigiosus mort, mais il aboutit à des résultats négatifs s'il répand simplement le Bacille Prodigiosus à la surface de la gélose.

Dans une série de travaux, à partir de 1912, Twort et Ingram (38) remarquent que le Bacille acido-résistant de Johne, ne se développant pas sur des milieux nutritifs ordinaires, peut y pousser cependant quand on incorpore au préalable à ces milieux d'autres bacilles acido-résistants pathogènes ou non ou même simplement les extraits glycérinés de ces bacilles. Ces auteurs obtiennent les meilleurs résultats avec le Bacille de la phléole, de moins bons avec le Bacille tuberculeux humain, de moins bons encore avec le Bacille tuberculeux aviaire, des résultats nuls avec le Bacille tuberculeux bovin.

En 1915 Bottomley (39) montre qu'un extrait alcoolique de tourbe «bactérisée» c.-à-d. ensemencée depuis quelques jours avec une culture mixte de microbes aérobies du sol, stimule la culture de l'Azotobacter chroococcum et active en même temps la propriété qu'il possède de fixer l'azote.

Mockeridge (40) s'appuyant sur ces travaux étudie le pouvoir favorisant des extraits de tourbe bactérisée sur les Bactéries nitrifiantes du sol.

Thjötta et Avery (41) ayant démontré en 1920-1921 que les facteurs de croissance pour les bactéries qui se trouvent dans le sang sont au nombre de 2, le facteur X et le facteur V, ont découvert en même temps que le facteur V se retrouve également dans les tissus végétaux et dans les corps bactériens.

L'addition d'une culture de Bacilles de Friedlænder exerce également une action favorisante sur la culture du Streptocoque. En effet Weichardt (42) note des différences de l'ordre suivant: un milieu témoin ne donnant aucune colonie du Streptocoque, l'addition de 0,2‰ d'un extrait d'une culture de Bacille de Friedlænder provoque la culture du Streptocoque dont on compte plus d'un million de colonies.

Davis (43) décrit à son tour en 1921 sous le nom de «phénomène de satellitisme» l'influence favorable que certaines bactéries exercent sur la culture d'autres bactéries. Il utilise même ce phénomène pour la classification des bactéries hémophiles. Il opère sur le Bacille de Pfeiffer et observe une culture plus abondante autour des colonies microbiennes associées. Toutes les bactéries essayées favorisèrent la culture du Bacille de Pfeiffer: Staphylocoques blanc et doré, Streptocoque hémolytique et Streptocoque viridans, Pneumocoques, Méningocoque, Bacille diphtérique, Sarcines, etc.

L'effet stimulant est produit par les bactéries vivantes et par les bactéries tuées, mais comme l'avait déjà remarqué Luerssen, l'observateur constate la nécessité d'incorporer ces germes au milieu de culture pour les rendre actifs. Il est donc strictement nécessaire que le facteur diffuse dans le milieu nutritif. Ce facteur n'est pas thermostabile.

Les facteurs favorisants contenus dans les extraits de bactéries semblent agir en association avec l'hématine ou l'hémoglobine.

Le Bacille de Pfeiffer est le seul qui soit favorablement influencé dans sa culture par des souches homologues ou hétérologues, tandis qu'il semble que les autres bactéries hémophiles ne révèlent jamais une stimulation de leur croissance due au «commensalisme». Elles favorisent cependant elles-mêmes la culture du Bacille de Pfeiffer.

Davis, Rivers et Leuschner, Kristensen ont utilisé l'action favorisante positive ou négative produite par certaines bactéries hémophiles à l'égard d'autres pour les différencier les unes des autres.

Tjötta (44) montre en 1921 le pouvoir favorisant la culture du Bacille de Pfeiffer que possède la substance mucoïde secrétée par le Bacille de Friedlænder et par d'autres bactéries. L'auteur met en évidence la présence de ces facteurs dans des suspensions salines des cultures de ces bactéries tuées à la chaleur et aussi dans l'extrait aqueux de ces cultures. Les extraits activants peuvent être bouillis pendant 10 minutes (mais non pas être chauffés à 115°) et filtrés à travers une bougie Berkefeld sans perdre de leur pouvoir de stimulation. Ils sont solubles dans l'eau et contiennent très peu d'azote, environ 0,116%.

Ce pouvoir activant se manifeste par une culture plus abondante et par une incubation plus courte. On voit souvent apparaître la culture après 3 à 4 heures et on peut constater la présence d'ondes bactériennes après 6 heures. L'effet de ces extraits est plus facile à voir en milieu liquide que sur milieu solide.

Borrel, Boez et de Coulon (45) signalent en 1923 l'existence d'une substance élaborée dans les milieux de culture du Bacille tuberculeux qui active la croissance de ce bacille. Le facteur activant exerce à dose minime son action. L'addition de 1/100 cmc de filtrat de liquide issu d'une culture âgée de 2 mois de bacilles humains à un milieu synthétique donne le meilleur résultat. Le facteur traverse les filtres Chamberland L_1 et L_3, il n'est pas spécifique. L'action de la chaleur sur ce facteur est intéressante à noter:

à 60° elle favorise le facteur;

à 110° et même à 120° elle ne le détruit pas après 15 minutes;

à 180° à l'étuve sèche pendant 1 heure elle le détruit.

Selon ces auteurs les agents favorisants contenus dans les cultures semblent appartenir au groupe des auximones de Mockeridge et Bottomley.

L'influence de filtrat de vieilles cultures de bactéries a été étudiée récemment par divers auteurs.

En 1928 Hartoch et Joffe (46) indiquent que de tels filtrats empêchent la croissance, que leur action n'est pas spécifique et qu'elle peut être en partie évitée par addition d'hydrates de carbone et de peptone. Ces auteurs concluent en disant que cette action néfaste de filtrats n'est due qu'en partie à l'épuisement du milieu de culture mais qu'elle aurait lieu à la suite de l'accumulation de produits d'échange de bactéries.

Ces travaux furent repris par Olitzki (47) qui confirme en partie les résultats précédents. Son étude porte sur le Bacille typhique et le Bacille Proteus. Il affirme l'action nuisible de filtrats de vieilles cultures et cette action ne peut être compensée ni par addition d'hydrates de carbone, ni par changement de réaction du milieu, ni même par apport de facteurs de croissance et est attribuée pour cette raison à la présence de substances fixes.

Dans un récent travail Palgen (48) en 1935 rapporte ses observations sur le pouvoir microbicide des filtrats bactériens. Il expérimente sur le Staphylocoque et le Colibacille. L'auteur constate comme précédemment que l'absence de multiplication dans les filtrats n'est pas imputable à un appauvrissement du milieu, mais à la présence de substances bactéricides. Ces dernières résistent à une température de 60° C. Fait curieux, on obtient des résultats différents suivant que l'on chauffe le liquide centrifugé ou des filtrats.

Pour conclure ce chapitre nous donnons un milieu à base d'extrait bactérien employé par Giscard (49) pour la culture du Gonocoque:

Dans une grande boîte de Roux, Giscard cultive une bactérie du type entérocoque ou pseudodiphtérique. Cette culture est émulsionnée dans 50 cmc d'eau physiologique stérile, puis laissée 24 heures à l'étuve à 37°. Au bout de ce temps l'autolysat est centrifugé, puis filtré sur bougie Chamberland L_3. A des tubes de gélose ordinaire à 3% fondue et refroidie vers 45° on ajoute aseptiquement le filtrat ainsi obtenu dans la proportion de 1 partie pour 3 parties de gélose. On mélange par rotation, on incline les tubes et on laisse refroidir.

Chapitre III.

INFLUENCE DE FILTRATS DE CHAMPIGNONS INFERIEURS SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES.

Il était intéressant de voir dans quelle mesure des champignons, toujours à la disposition au laboratoire, pouvaient opérer la synthèse de facteurs de croissance et surtout, comment à l'aide de simples filtrats, il était possible d'accélérer la croissance bactérienne. C'est principalement dans les dernières années que l'étude de l'importance de filtrats issus de la culture de champignons inférieurs s'est étendue. Mais malgré les récents travaux scientifiques le problème attend encore sa solution.

Dès 1906 Friedberger et Doepner montrent que de vieilles cultures de bacilles lumineux qui ont perdu leur pouvoir lumineux le récupèrent en présence de diverses Moisissures ou même de filtrats de celles-ci. Ils se servent d'Aspergillus fumigatus, de Mucor stolonifer, de Penicillium glaucum.

Vaudremer (50) dans ses nombreux travaux sur le Bacille tuberculeux, note l'influence que peut avoir un filtrat aspergillaire sur la culture du Bacille tuberculeux. Il opère ainsi:

Une culture jeune d'Aspergillus fumigatus poussée sur gélose au bouillon de haricots est ensemencée sur du liquide de Raulin à 2%. Au bout d'un mois la récolte est mûre. On décante le mycélium et on le broye avec du sable, on filtre sur bougie L^3 le jus obtenu par broyage et le milieu de culture mélangés. La réaction est neutre à la phénolphtaléine.

3 cultures de Bacilles de Koch (humain, bovin, équin) sur bouillon glycériné, âgées de 3 semaines, sont décantées délicatement de façon à retenir le voile et remplacées par le

liquide aspergillaire filtré. Les flacons sont mis à l'étuve à 38°, un échantillon de chaque souche est laissé au laboratoire. Les flacons dans l'étuve à 38° deviennent troubles au 4e jour. Les échantillons laissés au laboratoire le deviennent le 11e jour.

Un prélèvement fait dans les deux cas montre que ce trouble est dû à une culture abondante composée de 2 sortes d'éléments. Les uns sont des granules isolés ou réunis en courtes chaînettes, les autres sont des bacilles en massue contenant des granules. Les formes granulaires correspondent aux bacilles bovins et humains, les formes bacillaires dérivent du bacille équin. Le plus grand nombre des germes a perdu son acido-résistance.

Repiqués sur gélose, ces éléments donnent des colonies d'aspects différents et ne sont pas acido-résistants.

L'auteur constate aussi que les Bacilles tuberculeux humains virulents, après 24 jours de macération dans l'extrait filtré d'Aspergillus fumigatus à la température de 39° ne sont plus pathogènes:

1) pour le cobaye, sous la peau et dans le péritoine,

2) pour le lapin dans les méninges.

D'autre part le liquide de Raulin (sucré à 2% additionné de 2% de carbonate de chaux) sur lequel a poussé à 22° pendant 8 jours une culture d'Aspergillus fumigatus n'agit pas sur la tuberculine brute glycérinée. Mais si l'on prend le mycélium broyé d'une culture d'un mois, c'est-à-dire ayant atteint la maturité, la bouillie agit sur la tuberculine. Le principe actif résiste à l'ébullition pendant 2 minutes, mais le broyage du mycélium est nécessaire.

Selon Vaudremer il existe dans le filtrat aspergillaire des ferments qui sont mis en liberté soit par voie autolytique, soit au moment de l'écrasement mécanique des cellules lors de la préparation du filtrat. C'est à ces ferments que Vaudremer attribue les mutations du Bacille tuberculeux.

Rappin (51), Machado (52), Sweany (53) à leur tour ont pu constater le fait de l'apparition de formes non acido-résistantes sous l'influence de Moisissures et sont d'avis qu'il s'agit d'un ferment à action catalytique.

Milochevitsch (54) fait les mêmes observations pour le Bacille de Timothée que Vaudremer pour le Bacille tuberculeux. Il prépare le filtrat aspergillaire en suivant la technique utilisée par ce dernier.

Le Bacille de Timothée dans les cultures à base de filtrat se compose en grande partie de formes non acido-résistantes. Tandis qu'un frottis à partir du milieu témoin montre des bacilles acido-résistants courts et homogènes pour la plupart, les bacilles qui ont poussé dans le filtrat aspergillaire présentent divers aspects: les uns ont la forme d'un bâtonnet droit, sont bleu-clair à granulation bleu-foncé. D'autres sont un peu plus grands avec des granulations aux extrémités et ressemblent alors au Bacille diphtérique. Enfin il s'y trouve quelquefois des formes imposantes à fortes granulations bleues avec un corps cellulaire court, pâle et indistinct. Repiqués sur milieux solides, ces bacilles ne récupèrent pas aussitôt leur acido-résistance.

Les expériences de Milochevitsch furent poursuivies et en partie confirmées par Kirchner (55). Son étude porte sur des filtrats provenant de cultures d'âges différents. Les cultures vieilles de 11 à 16 semaines sont sans action sur le bacille. Même après de nombreux passages dans le filtrat aspergillaire, les cultures, repiquées sur milieux solides, présentent l'aspect macroscopique typique et regagnent bientôt leur acido-résistance.

L'auteur conclut en disant que s'il faut attribuer cette perte d'acido-résistance à un ferment, il faudrait que ce ferment soit thermostabile, attendu que des filtrats chauffés pendant 30 minutes à 70° n'ont rien perdu de leur pouvoir.

Goy (56) a beaucoup contribué à faire progresser nos connaissances sur les facteurs de croissance extraits de certaines cultures d'organismes inférieurs. Ses expériences ont porté sur les facteurs activants contenus dans les cultures de Mucors. L'auteur a tout d'abord constaté que le développement de l'Aspergillus niger est considérablement influencé par addition au liquide de Raulin de quantités minimes de filtrat d'une culture de Mucor.

Cette substance activante traverse aisément la bougie Chamberland, elle résiste à la tyndallisation à 60°, elle supporte même la température de stérilisation et n'est détruite que par un chauffage à sec à 170° au four à flamber. Non seulement cette substance résiste à ces températures élevées, mais le filtrat non chauffé est dépourvu de propriétés activantes.

L'auteur réussit à extraire par l'éther une substance organique cristallisable et lui attribue une nature hydrocarbonée.

En ce qui concerne le mode d'action, il est mal connu. Plusieurs hypothèses se présentent. Il est impossible de savoir si le chauffage agit en détruisant un agent antagoniste ou en modifiant la nature chimique de la substance active. Pour Goy cette deuxième hypothèse paraît la plus vraisemblable.

Dans la suite de ses recherches, l'auteur constate que le filtrat stérilisé provenant de la culture de certains Mucors agit favorablement sur le développement de quelques microbes pathogènes de l'homme. Certains d'entre-eux, ensemencés comparativement avec ou sans filtrat, donnent plus de résultats positifs dans les premiers milieux et l'amorçage est plus rapide. Les expériences ont prouvé l'action stimulante de ces facteurs dans la culture du Bacille histolyticus, du Bacille diphtérique, du Streptocoque, des Bacilles perfringens et sporogenes. Ces deux derniers germes sont fortement protéolytiques, ce qui va à l'encontre d'une hypothèse qui avait été émise, d'après laquelle les bacilles protéolytiques seuls ne tiraient aucun parti dans leur développement de facteurs activants.

La substance accélératrice ne favorise toutefois le développement du Bacille de Koch sur milieu Pétroff qu'à la condition d'y avoir été adjointe avant la coagulation de l'albumine.

L'auteur conclut à la non-identité des corps appelés vitamines d'avec celui trouvé au cours de ses recherches. Cette substance prend figure de véritable vitamine de croissance sans pouvoir y être «assimilée».

Se basant sur les recherches de Goy, Tempé (57) propose pour la culture du Gonocoque un milieu à base de filtrat de Mucor Koji qui lui a donné d'excellents résultats.

L'activité de cet agent favorisant se manifeste même à la dose de 1 à 2 gouttes de filtrat pour 10 cmc de milieu, mais n'apparaît qu'après chauffage à 80° au moins. Ce principe actif traverse les bougies Chamberland, il est thermostabile et résiste à un chauffage prolongé à 120°.

Plus récemment, Vaudremer et Mlle Brun (58) constatent pour le Bacille de Hansen, voisin du Bacille de Koch sous certains aspects, des mutations analogues à celles trouvées pour le Bacille de Koch lorsqu'il est ensemencé comme lui sur un milieu à base de filtrat aspergillaire. Ces mutations sont plus ou moins rapides suivant les différents lépromes considérés et l'aspect microscopique varie de même avec les cultures.

Après un temps variable de 15 à 30 jours, on voit des éléments pseudo-méningococciques prenant le Gram. A ce stade succède bientôt pour certains lépromes un stade bacillaire cyanophile, à formes bacillaires fines, granuleuses, prenant le Gram, disposées en palissade, avec un aspect diphtéroïde. Pour d'autres on voit la forme granulaire cyanophile donner naissance à un réticulum d'aspect mycélien disparaissant dans la suite, cyanophile et enserrant un amas de bacilles acido-résistants. Enfin, pour un léprome ayant présenté une évolution rapide, le liquide aspergillaire montre de nombreux bacilles et de très fines granulations acido-résistantes.

A. et R. Sartory et J. Meyer (59), dans un travail publié récemment à l'Académie de Médecine, indiquent la spécificité pour le Gonocoque de facteurs accessoires provenant des cultures de Mucors Koji, spinosus et de Schizosaccharomyces hominis.

Ces facteurs activants sont thermostabiles et provoquent un départ rapide des cultures du Gonocoque. L'addition de filtrat chauffé dans la proportion de 10% semble donner le milieu optimum.

L'ensemencement de prélèvements blennorhagiques provenant d'une maladie chronique sur jus de broyage filtré et non chauffé d'une culture de Mucor ou de Schizosaccharomyces permet la culture de l'isolement du Gonocoque impossible à obtenir habituellement.

Ces cultures montrent des formes évolutives du Gonocoque à caractères morphologiques atypiques, cyanophiles, capables de se transformer en diplocoques Gram négatifs prenant tous les caractères du Micrococcus gonorrheae.

Ces substances sont spécifiques et ne doivent pas être assimilées aux vitamines.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre premier.

PREPARATION DES FILTRATS DE CHAMPIGNONS.

a) *Cultures.*

Dans la première partie de notre travail, nous avons fait un exposé assez développé sur l'influence des extraits cryptogamiques employés jusqu'à ce jour en matière bactériologique. Nous avons essayé de mettre en évidence les avantages de tels produits et les critiques qu'ils ont suscitées.

Nous appuyant sur les récents travaux de Tempé, sur ceux de Vaudremer et Mlle Brun, de A. et R. Sartory et J. Meyer, déjà signalés dans l'historique de la question, nous avons étudié l'influence de certains filtrats de champignons inférieurs sur la croissance des bactéries.

Après quelques essais, notre choix s'est arrêté sur quatre espèces de champignons:

ASPERGILLUS FUMIGATUS FRESENIUS
SCHIZOSACCHAROMYCES HOMINIS BENEDEK
MUCOR NIGRICANS VAN TIEGHEM
MUCOR PLUMBEUS BONORDEN

L'Aspergillus fumigatus est un champignon du groupe des Ascomycètes. Le pouvoir pathogène, surtout celui de la souche utilisée, est bien connu.

Le Schizosaccharomyces hominis appartient au groupe des Levures caractérisées par leur pouvoir fermentatif. Ce champignon a été isolé par Benedek du sang humain.

Quant aux deux Mucors, rentrant dans la famille des Oomycètes, ils ont été utilisés dans des travaux antérieurs comme agents de facteurs activants.

Ces champignons ont été ensemencés sur des milieux favorables à un bon développement:

— l'Aspergillus fumigatus sur milieu de pommes de terre.

— le Mucor plumbeus sur milieu Sabouraud glucosé ou sur pommes de terre.

— le Mucor nigricans et le Schizosaccharomyces hominis sur milieu Sabouraud maltosé.

Tous ces milieux ont été ajustés à un pH: 5,8.

Nous avons ainsi obtenu des cultures luxuriantes et caractéristiques et nous avons repiqué les divers microorganismes tous les 15 jours.

Nous tenons à résumer brièvement les propriétés morphologiques de ces champignons:

l'Aspergillus fumigatus, agent de mycoses des voies respiratoires, est très répandu. Il est caractérisé par un mycélium de 2 à 3 μ formant un tissu assez serré. Les conidiophores, en formes de pilons, gris fuligineux, sont couverts seulement dans la moitié ou les deux tiers supérieurs de basides émettant un panache cylindrique de conidies vert de gris, glauques, brunâtres ou grisâtres, rondes ou subrondes et d'un diamètre oscillant entre 2 et 4 μ.

Le Schizosaccharomyces hominis comporte des éléments végétatifs très petits de 2 à 4 μ, ils sont isolés, géminés ou réunis en chaînettes et se multiplient très rapidement par scissiparité.

Le Mucor nigricans se rencontre fréquemment sur les matières d'origine végétale. Il présente des filaments mycéliens abondants à internœuds, à membrane lisse d'abord incolore, à la fin brune. Les sporanges sont globuleux, au début blanc de neige, noirs à la maturité et à large columelle. Les spores ovoïdes possèdent une membrane épaisse.

Le Mucor plumbeus a été trouvé dans le pus d'une sinusite de cheval. Son mycélium s'allonge à peine et ses courts rameaux sont gonflés. Les spores germent de 6 à 40°.

A l'aide de ces quatre souches nous avons préparé des cultures en milieux liquides. Pour éviter tout apport possible d'autres facteurs activants contenus dans les milieux ordi-

naires, Goy se servait du liquide de Mayer pour la culture des microbes. Pratiquement on obtient les mêmes résultats avec du bouillon glucosé à 1‰ dont voici la formule et le mode de préparation:

Extrait Liebig	5
Peptone Chapoteaut	10
Chlorure de sodium	5
Eau	1000

Dissoudre à feu doux, alcaliniser au besoin. Porter à l'autoclave à 117° pendant cinq minutes. Filtrer à chaud par un filtre mouillé. Ajouter le glucose.

Répartir en tubes et stériliser à 110°-115°.

Afin d'obtenir une plus grande quantité de filtrat nous avons effectué nos cultures dans des fioles d'Erlenmeyer. Pour vérifier si la production du facteur stimulant ne dépendait pas de la valeur nutritive du milieu de culture, nous avons préparé une série de cultures en milieu de Meyer glucosé préparé comme suit:

Peler des pommes de terre et les découper en fragments minces. Faire cuire 1 partie de fragments de pommes de terres dans 2 parties d'eau. Laisser macérer 3 à 4 heures et filtrer sur toile. Ajouter le glucose, répartir, boucher et stériliser à 120° pendant 30 minutes à l'autoclave.

Les cultures ont été faites à la température uniforme d'une étuve réglée à 27°.

Nous donnons ici les propriétés culturales dans les conditions de notre expérimentation:

1) *en bouillon glucosé*

Aspergillus fumigatus: formation d'un voile blanc, duveteux au début, puis gris, verdâtre sur les bords. Au bout de quelques jours cette coloration verte s'est étendue à toute la surface.

Schizosaccharomyces hominis: apparition d'un léger voile grisâtre, qui, après 48 heures, devient gris-grémeux à surface lisse, puis prend un aspect plissé jaunâtre.

Mucor nigricans: formation d'un début de voile blanc légèrement duveteux, 48 heures après, le voile devient nuageux et noirâtre.

Mucor plumbeus: l'ensemencement a donné lieu, au bout de 24 heures, à de petits amas mycéliens blancs, dispersés à la surface du milieu et qui après 48 heures ont formé un léger voile blanc.

2) *en pommes de terre glucosé*

Aspergillus fumigatus: léger anneau gris, devenant gelatineux et qui, au bout de 3 jours, forme une espèce d'entonnoir.

Schizosaccharomyces hominis: voile grisâtre, plissé, entouré d'une zone noirâtre, tombant au fond. Il se forme 24 heures après, un deuxième voile avec anneau noir, regagnant le premier.

Mucor nigricans: voile blanc, duveteux au début, puis devenant nuageux et noirâtre.

Mucor plumbeus: légères traînées blanches qui gagnent peu à peu toute la surface.

Nous avons constaté que l'aspect des champignons ne varie guère d'un milieu à l'autre. Mais nous avons remarqué d'une part que la filtration des cellules en jus de pommes de terre était très lente et d'autre part que les filtrats obtenus à partir de ces dernières n'étaient guère limpides et allaient nuire à la transparence des milieux de culture que nous voulions confectionner à base de filtrats. C'est pour ces deux raisons que nous avons abandonné le milieu Meyer pour nous en tenir uniquement au bouillon de viande après avoir vérifié toutefois que les milieux avec filtrats issus de cultures de champignons sur pommes de terre n'étaient pas plus favorables que ceux provenant des cultures en bouillon.

Toutes les cultures ont été effectuées à l'état pur et toujours dans les mêmes conditions.

A quel moment de l'évolution cellulaire ce facteur actif se manifeste-t-il? Est-il engendré tout au début ou au déclin

de la vie de l'être? Il est difficile de le déterminer car le renouvellement des êtres mis en jeu est si rapide et le milieu où s'opère la synthèse chimique si réduit. Tout ce que nous avons pu faire c'est établir à quel moment ces cultures élaborent la substance accélératrice. Nous avons dans ce but, préparé 3 séries de cultures d'âges différents:

a) une culture âgée de 3 jours,
b) une culture âgée de 10 à 15 jours,
c) une culture âgée de 2 mois.

Nous avons observé que les résultats obtenus sont loin d'être les mêmes avec les filtrats préparés à partir de cultures âgées et de cultures jeunes. Nous les donnerons ultérieurement. Disons cependant tout de suite que les champignons, dès leur plus jeune âge, ont déjà engendré le facteur activant. Il nous semble même que cette substance est élaborée tant qu'il y a développement du champignon et que la culture perd la propriété activante avant sa propre lyse. Que devient alors le facteur en question? Son existence éphémère ne peut être due à sa nature instable, car il n'est pas détruit par un chauffage à 120°.

b) *Filtration*

Vaudremer et Mlle Brun se sont débarrassés des éléments figurés de la culture aspergillaire par filtration sur bougie Chamberland L[3]. A.-R. Sartory et J. Meyer ont opéré de même.

Nous avons commencé par une filtration à travers papier filtre ordinaire. Les cultures ont été au préalable agitées pour écraser les cellules renfermant la substance activante.

Nous appuyant sur les recherches de Tempé qui a démontré que seule la substance chauffée possédait une action stimulante, nous avons porté le tout à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

Poursuivant nos recherches, une autre filtration s'est imposée à nous: l'ultrafiltration.

Dans la préparation des filtres de collodion, nous nous sommes inspirés de la Thèse de Monal (60) à laquelle nous renvoyons pour de plus amples détails.

L'influence la plus importante dans l'ultrafiltration revient à la préparation et surtout à la composition de la solution de coton nitrique dans le mélange alcool-éther. Comme l'indique Monal, il faut varier la formule des solutions suivant le but qu'on veut atteindre. Pour l'ultrafiltration sous pression d'un liquide facilement altérable, il importe d'obtenir une filtration rapide. D'autre part, ignorant la nature de notre facteur activant, il fallait disposer d'une membrane n'ayant aucune action inhibitrice sur ce corps. Nous avons eu recours à la formule suivante qui nous a donné de bons résultats:

Alcool absolu ..... 48 cc
Ether sulfurique anhydre .. 60 cc
Coton octonitré stabilisé ... 4 gr.

Nous avons ajusté au pH 5,8 pour les cultures envisagées.

Pour réunir les 3 produits nous avons opéré de la façon suivante: Introduire dans une large éprouvette le coton octonitré bien effiloché et y ajouter l'alcool. Mélanger bien pour que tout le coton soit imbibé d'une façon homogène, puis ajouter l'éther sulfurique. Boucher hermétiquement l'éprouvette avec un bouchon de liège et agiter fortement pendant quelques minutes. Ouvrir ensuite le flacon pour éviter une trop grande pression à l'intérieur qui pourrait faire éclater le verre. Reboucher et laisser reposer la solution pendant quelques heures pour qu'elle se débarrasse de l'air. Conserver à l'abri de la lumière et dans un endroit frais.

Il est bon de laisser mûrir la solution de coton octonitré dans l'alcool-éther au moins pendant 8 jours avant l'emploi, car les membranes préparées à partir d'un collodion frais sont moins homogènes et résistantes que celles préparées au moyen d'un collodion mûri. A cet effet on place la solution dans un flacon bouché pendant environ 8 jours à l'étuve à 37°. Ensuite on doit placer le collodion au frais et à l'abri de la lumière où il se conserve fort longtemps.

Pour la préparation des sacs de collodion, nous avons utilisé des mandrins, destinés à donner la forme au sac de collodion. C'est un tube de verre fermé et arrondi des 2 côtés, portant un renflement aux 2/3 de sa longueur dont le diamètre le plus grand est de 40 mm.

Les dimensions de nos mandrins pour la filtration à pression sont: 17/100 mm.

Avant usage, ces mandrins ont été lavés et nettoyés par immersion pendant 30 minutes dans une solution sulfochromique, puis rincés à l'eau ordinaire et finalement à l'eau distillée. On les sèche à l'étuve et au moment de l'emploi on les sèche une seconde fois au-dessus d'un four électrique de sorte que, au moment où on introduit le mandrin dans le collodion, il a environ une température de 37°. Ceci pour éviter l'adhésion de toutes petites gouttelettes d'eau sur les parois du mandrin occasionnant des dilutions imprévues de la solution de collodion et une répartition inégale et non homogène du collodion.

Pour faciliter le détachement de l'ultrafiltre, nous avons enduit le mandrin d'un peu de paraffine de la façon suivante: à l'aide d'une baguette de verre que nous avons préalablement trempée dans la paraffine nous avons décrit au 1/3 supérieur du renflement un cercle.

D'un seul coup nous avons plongé la partie longue du mandrin chaud dans le collodion jusqu'au milieu du renflement en tenant le mandrin par son extrémité courte. De nombreuses bulles gazeuses se sont échappées et ont gagné la surface. Quand toutes eurent disparu, nous avons attendu à peu près 20 secondes, puis avons retiré lentement le mandrin de son bain. On tourne alors le mandrin en position horizontale rapidement entre les doigts pour répartir d'une façon homogène le collodion et on laisse sécher à l'air libre environ 60 secondes. Puis on introduit le mandrin une deuxième fois dans le collodion en opérant comme précédemment et on sèche le mandrin en le maintenant horizontalement entre les doigts. On le plonge ensuite dans un récipient renfermant de l'eau distillée froide.

L'introduction du mandrin, muni de son enveloppe en collodion, dans l'eau doit se faire dans des conditions toujours identiques.

Cette première manipulation terminée, on procède immédiatement au décollement du collodion.

Nous avons opéré ainsi:

Un grand tube à essai ayant 42 mm de diamètre et 120 mm de hauteur muni d'un ajutage avec robinet à son 1/3 supérieur est relié au moyen de ce tube à la trompe à eau. Le mandrin, avec sa gaine de collodion, est entouré directement au-dessous du renflement d'une bague en caoutchouc (bouchon perforé) ouverte par une incision radiaire, de façon à ce que l'on puisse écarter facilement les 2 bouts sectionnés et glisser sans crainte de déchirure, l'anneau autour du mandrin. On mouille alors le tout à l'eau et on décolle au moyen d'un scalpel le sac de collodion entourant le renflement du mandrin. La pellicule de collodion en se repliant, vient alors s'appliquer intimement à la surface de l'anneau en caoutchouc. Puis on monte le mandrin à l'aide de l'anneau sur le grand tube à essai relié à la trompe à eau. On commence à faire le vide en réglant la pression. Habituellement on n'a pas besoin de dépasser 15 à 25 mm de mercure pour obtenir le décollement en bougeant avec précaution le mandrin pour faire arriver l'air entre la membrane de collodion et le mandrin même.

On démonte alors le mandrin du tube à vide, on enlève en écartant les 2 sections l'anneau en caoutchouc et on peut facilement retirer le sac de colodion de son mandrin.

On obtient ainsi un petit sac cylindrique avec des parois en double couche de collodion que nous introduisons immédiatement dans de l'alcool à 70° afin d'éviter le déssèchement de la membrane et pour en obtenir une résistance suffisante pour le montage du sac.

Pour cette dernière opération, nous nous sommes servis d'un manchon en verre de dimensions égales au mandrin. Le manchon est ouvert des deux côtés. Au 1/3 supérieur existe un renflement servant d'entonnoir. Nous avons adapté sur ce tube un large anneau de caoutchouc au-dessus de l'ultrafiltre. Le caoutchouc s'adaptant hermétiquement sur le manchon, celle l'ultrafiltre sur le verre et aucun danger de fuite ne peut exister. On lave à l'eau distillée.

Nos cultures de champignons ont été introduites dans les filtres en prenant les précautions nécessaires pour ne pas entraîner trop de matières végétatives qui augmenteraient la durée de l'opération.

L'appareil ainsi monté, on le fixe à un système fournissant la pression et on filtre sous une pression de 60 à 80 mm d'Hg.

L'opération a été longue en raison de la réaction acide de nos cultures qui entrave la rapidité de la filtration. Mais elle nous a permis d'observer que des éléments avaient passé l'ultrafiltre. Nous avons fait des frottis de ces 4 filtrats que nous avons colorés par la méthode de Pappenheim. Les Mucors et le Schizosaccharomyces hominis se sont montrés positifs. On a pu distinguer des formes en symplastes ressemblant à des colonies de Staphylocoques et de Streptocoques. Pour les deux Mucors nous avons vu des formes tout à fait atypiques:

1° des formes en bâtonnets effilés aux deux pôles, fortement granuleux à leur intérieur et souvent munis d'une cloison interne;

2° des amas colorés en rose, renfermant un nombre variable d'éléments cocciformes très petits se colorant en violet. Ces pseudocoques étaient toujours situés vers la périphérie des amas et pourraient être comparés à des formes de symplastes d'après Enderlein. Toujours est-il que ces formes sont complètement atypiques et nous ont fait croire à une impureté.

Quant au Schizosaccharomyces hominis nous avons pu constater les mêmes formes granuleuses agglomérées comme par un phénomène d'agglutination.

Les cultures que nous avons effectuées sur des milieux appropriés nous ont prouvé cependant que notre technique de filtration a été impeccable et que nous avons opéré avec toutes les garanties d'asepsie rigoureuse.

Une goutte de filtrat ensemencée sur milieu approprié à chaque champignon a donné naissance à des cultures luxuriantes. La croissance sur ces substrats nutritifs a été nettement retardée et l'amorcement des cultures était constatable après 4 à 5 jours.

L'aspect même de ces cultures initiales a été atypique au début. Elles se présentaient sous forme de petites colonies de la grosseur d'une tête d'épingle, blanc-crémeux. Ces colo-

nies ont apparu sur toute la surface du milieu solide et sont restées isolées pendant 48 à 72 heures. C'est seulement au bout de ce temps que la «mochlolyse» s'est installée, les colonies ont commencé à se fusionner et à former un tapis homogène sur le substrat solide. Vers le dixième jour à peu près, les cultures des trois champignons provenant de l'ultrafiltrat ont repris leur aspect habituel. Les réensemencements effectués à partir de ce moment ont donné des cultures luxuriantes et caractéristiques pour chaque espèce.

Nous avons pu observer lors de l'ultrafiltration que les deux Mucors se sont servis du collodion comme substance nutritive. Les filtres que nous avons conservés ont été revêtus de mycélium, qui avait traversé le filtre de l'intérieur vers l'extérieur.

Tous les filtrats que nous avons préparés ont été stérilisés à l'autoclave et ont facilement pu être conservés pendant un mois à la glacière sans perdre leurs propriétés comme nous allons avoir l'occasion de le démontrer.

Chapitre II.

TECHNIQUES ET METHODES EMPLOYEES POUR MESURER L'INFLUENCE DE FILTRATS DE CHAMPIGNONS SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES.

La croissance est un fait biologique qui se déroule de la même manière dans tout le règne, animal et végétal.

Suivant l'avis des physiologistes et des pédiâtres, elle peut être définie, au point de vue chimique et morphologique, comme un développement propre à la nature de chaque individu. Mais elle se manifeste différemment chez les macro-organismes et chez les microorganismes. Elle aboutit chez les premiers à un développement total de l'être, chez les seconds à un accroissement du nombre des individus, à une multiplication. C'est cette prolifération que nous allons étudier.

Il est certain que les cultures d'organismes inférieurs sont génératrices de facteurs activant la croissance bactérienne. Pourtant une analyse qualitative de tels facteurs ne nous a pas été possible. L'influence que ces substances activantes exercent, dépend-elle seulement de la quantité mise en jeu? Nous verrons plus loin que ce n'est pas le cas. Il a fallu y remédier en déterminant l'influence que provoquent ces facteurs activants contenus dans les filtrats fungiques sur la croissance et pour cela, examiner l'évolution des bactéries sur des milieux additionnés de filtrats renfermant les facteurs stimulants comparativement à des milieux témoins.

Lorsque l'on veut apprécier la croissance des bactéries, il faut considérer les 4 points suivants:

1) le départ de la culture,
2) la rapidité d'apparition,
3) l'abondance de la culture, mesurée par la pesée de la masse ou par les méthodes qui vont suivre,
4) la longévité de la culture.

Les procédés courants de mesure de croissance tels que la numération des bactéries par la méthode de dosage des globules sanguins (Hueppe, Winterberg), l'examen d'un frottis avec numération des germes par champ microscopique (Klein, Hehewerth, Wright), la méthode colorimétrique (Zelikow) ne sont pas applicables sans modifications.

D'ailleurs aucune mesure n'est exacte, car il faut compter que dans les cultures, il existe toujours, à côté des bactéries vivantes, un certain nombre d'individus morts.

Une méthode optique utilisant le trouble que provoquent les bactéries en milieu liquide comme indice de leur multiplication n'est pas à rejeter et a déjà eu quelques vagues applications. Mais l'emploi du néphélomètre et du photomètre est encore peu étendu et leur précision n'est pas en harmonie avec les erreurs inévitables au moment de la lecture.

Un procédé de mesure par voie chimique, c'est-à-dire une méthode se servant d'une fonction biochimique propre à la bactérie (formation d'acidité, réduction du bleu de méthylène, etc.) comme indicateur n'est pas recommandable. Il est long et surtout il n'est pas applicable à toutes les bactéries, vu qu'elles ne jouissent pas toutes de telles propriétés. En outre, il faudrait savoir si les filtrats d'organismes inférieurs n'ont pas une action néfaste sur la réduction du bleu de méthylène par exemple et si d'autre part le filtrat n'entrave pas le pouvoir réducteur des bactéries.

Funk (61), Aron (62), Gralka (63) ont élaboré une méthode de mesure pour la substance activant la croissance de la levure. Bien que ce procédé soit peu pratique et n'ait pas donné de résultats constants, il permit toutefois d'étudier avec une certaine précision l'influence du facteur.

Rosenthal (64) et Dichtl (65) ont utilisé une méthode par sédimentation de germes et lecture volumétrique du culot de centrifugation et sont arrivés à des résultats assez satisfaisants.

Mais avant d'entrer dans des difficultés que présentait l'élaboration d'une méthode de dosage précis une autre question s'est posée à nous, notamment le choix d'un milieu de culture.

Leichtentritt et Zielakowski (66) dans leur étude sur l'importance des facteurs accessoires sur la croissance bactérienne se sont servis du milieu de Braun et Cahn-Bronner. Notre choix est tombé tout d'abord sur un milieu relativement riche et employé dans le même but par Tempé dans son étude sur le Gonocoque. La formule est la suivante:

foie de cheval coupé en morceaux 500 gr.
eau ..... 1000 gr.

Bouillir à petit feu dans une marmite fermée pendant 2 heures. Filtrer sur papier Chardin, ramener au volume primitif, ajouter:

peptone Chapoteaut ..... 20 gr.

neutraliser.

Pour la préparation de milieux solides, ajouter 20 gr. de gélose ‰. Ajuster au pH 7,2.

Répartir en tubes, stériliser à l'autoclave à 120°.

Les cultures obtenues sur ce milieu étaient luxuriantes, mais il fallait, pour mesurer spécialement l'action de cette «stimuline» utiliser de préférence un milieu relativement pauvre. Nous nous sommes arrêtés à un milieu couramment employé au laboratoire bactériologique, un milieu à base de foie de veau, peu riche en matières protéiques. D'ailleurs le milieu au foie de cheval laissait facilement déposer des phosphates gênant la lecture des résultats.

A quel milieu de culture fallait-il donner la préférence? Liquide ou solide? Nous nous sommes servis des deux milieux. Disons tout de suite qu'un milieu liquide serait toutefois préférable car il présente les avantages suivants:

1) un échange et une diffusion plus rapide des matières mises en présence,
2) l'addition plus facile de filtrats et de solutions tampons donnant ainsi la garantie indispensable que, pendant toute la durée de l'expérience, on garde la réaction de milieu désirée, c'est-à-dire pH = 7,2.

A l'emploi de milieux solides on peut objecter que, lors de l'addition de filtrats ou de solutions tampons, ils se troublent facilement et perdent ainsi leur homogénéité. D'autre part il est impossible d'ensemencer toute la surface du milieu, une adhérence de germes est inévitable et cette dose peu constante est responsable des résultats contradictoires qu'on observe en différents endroits de la culture. Ces inconvénients au moment de l'ensemencement se complètent pendant la numération des bactéries. Il est difficile en effet de faire des prélèvements sans entraîner une petite quantité du milieu de culture, qui, au microscope, entrave la lecture.

Nous avons toutefois eu recours, dans quelques essais, aux milieux solides, en essayant de détourner quelques-uns de ces obstacles.

Pour éviter l'adhérence des germes et pour pratiquer un ensemencement aussi uniforme que possible sur toute la surface du milieu, nous avons préparé une émulsion de bactéries dans du sérum physiologique stérilisé. Afin de dissocier les germes, nous avons agité énergiquement notre émulsion pendant environ 10 minutes dans un tube renfermant des perles de verre préalablement stérilisées.

Lors de notre expérimentation nous avons donc eu recours tout d'abord à trois méthodes différentes afin de pouvoir établir des comparaisons entre les résultats ainsi obtenus et déterminer notre méthode de choix:

1) Numération des colonies par la culture en boîtes de Pétri ou en fioles plates de Roux sur des milieux solides.
2) Numération des germes par la méthode de la numération des globules sanguins au moyen d'hématimètres spéciaux: Burker, Liebreich et Nageotte à profondeur de 0,025 mm.

3) Pesée de la masse bactérienne après culture sur milieu liquide et séparation du milieu par centrifugation et lavages successifs.

A) NUMERATION DES COLONIES.

Ce procédé nous a donné d'assez bons résultats, surtout dans la numération de colonies de bactéries chromogènes. En effet, elle nous a permis de mettre en évidence que les facteurs activants ne favorisent la croissance des bactéries qu'au début de leur évolution et ne déterminent qu'un amorçage plus rapide des cultures. Cependant la technique se montre peu pratique au moment de la numération des colonies. Les fioles de Roux, à la sortie de l'étuve, se recouvrent de buée et il faut, à l'aide d'écouvillons stériles, nettoyer le verre. D'autre part son exactitude est relative. Par comparaison avec les autres méthodes elle est peu précise, car les résultats obtenus ne sont souvent pas concordants.

B) NUMERATION DES GERMES.

Le procédé précédent n'étant pas toujours favorable, nous avons essayé de faire une détermination numérique des bactéries par la méthode de numération globulaire au moyen de l'hématimètre de Thomas-Bürker.

Le tableau que nous donnons ci-dessous indique les résultats obtenus avec cette méthode dans la culture de Sarcina aurantiaca par exemple. La numération a été effectuée une heure, deux heures et cinq heures après l'ensemencement.

TABLEAU I

Milieux de foie de veau additionnés de	Nombre de bactéries comptées après		
	1 heure	2 heures	5 heures
0,5 cc. de bouillon glucosé filtré (Témoin)	10	26	53
0,5 cc. de filtrat d'Aspergillus fumigatus	13	30	82
0,5 cc. de filtrat de Schizosaccharomyces hominis	26	45	124
0,5 cc. de filtrat de Mucor nigricans	24	56	143
0,5 cc. de filtrat de Mucor plumbeus	28	68	187

La moyenne a porté sur 4 essais.

La méthode est rapide. Un observateur expérimenté peut effectuer une numération en quelques minutes, tandis que par la méthode précédente on n'arrive au résultat que le lendemain, voir même quelques jours après. Elle permet aussi d'examiner la prolifération des germes à n'importe quel moment et dès le début de la croissance avant même que le trouble, indice de croissance dans un milieu liquide, ne soit encore visible. Mais souvent en raison de la multiplication prodigieuse des bactéries, il faut faire des dilutions qui arrêtent l'expérimentateur.

En comparant les résultats obtenus par ces 2 méthodes nous nous sommes aperçus que la croissance, tant sur les milieux témoins que sur ceux à base de filtrats, semblait régulièrement plus forte par la méthode de numération des colonies que par celle des germes.

Etant donné que toutes ces méthodes sont relatives et leurs résultats non concordants, nous avons jugé nécessaire d'élaborer une troisième technique afin de réaliser le maximum de garantie pour obtenir des résultats exacts et rigoureux.

C) PESEE DE LA MASSE BACTERIENNE.

Le procédé le plus scientifique et le plus direct est la pesée de la masse bactérienne.

Ici la difficulté a résidé dans l'obtention de la masse. La filtration indiquée par de nombreux auteurs n'a pu servir. En effet, nous avons fait une série d'expériences et obtenu après filtration et pesée de la masse bactérienne des résultats tout à fait discordants comparativement aux autres méthodes. Nous indiquons ces résultats dans le tableau II pour le Staphylocoque Masson.

En examinant les tableaux II et III, nous observons une discordance notable entre les résultats obtenus par voie pondérale après filtration du milieu et ceux obtenus par numération des germes. Ce fait était dû au passage à travers les pores du filtre de nombreux éléments.

TABLEAU II

Milieux de foie de veau additionnés de	Nombre de bactéries comptées après			Récolte en grammes pour 10 cc. de milieu
	1 heure	2 heures	5 heures	
0,5 cc. de bouillon glucosé filtré (Témoin)	26	58	73	0,0019
0,5 cc. de filtrat d'Aspergillus fumigatus . . .	15	31	66	0,0020
0 5 cc. de filtrat de Schizosaccharomyces hominis.	33	57	96	0,0016
0,5 cc. de filtrat de Mucor nigricans	36	79	113	0,0023
0,5 cc. de filtrat de Mucor plumbeus	47	109	134	0,0011

Des résultats analogues ont été obtenus pour la Sarcine dorée et sont indiqués dans le tableau III.

TABLEAU III

Milieux de foie de veau additionnés de	Nombre de bactéries comptées après			Récolte en grammes pour 10 cc. de milieu
	1 heure	2 heures	5 heures	
0,5 cc. de bouillon glucosé filtré (Témoin)	10	26	53	0,0023
0,5 cc. de filtrat d'Aspergillus fumigatus . . .	13	30	82	0,0047
0,5 cc. de filtrat de Schizosaccharomyces hominis.	26	45	124	0,0045
0,5 cc. de filtrat de Mucor nigricans	24	56	143	0,0075
0,5 cc. de filtrat de Mucor plumbeus	28	68	187	0,0052

Il fallait donc trouver un autre moyen pour récolter les bactéries. Nous avons songé à opérer par centrifugation et à peser ensuite le culot de centrifugation. Nous indiquons notre technique:

Dans des tubes à centrifugation, de grandeur moyenne, tarés et stérilisés, nous avons introduit 10 cc de milieu de foie de veau liquide, 0,5 cc de filtrat et 0,5 cc de notre émulsion bactérienne. On bouche soigneusement et on place le tout à

l'étuve à 37° pendant 3 jours. Le troisième jour, nous avons retiré les cultures de l'étuve et nous les avons centrifugées à deux reprises pendant 45 minutes dans une centrifugeuse électrique (3000 tours à la minute). Le lendemain, nous avons centrifugé une troisième fois pendant 3/4 d'heure. Dans l'intervalle des centrifugations les cultures ont été portées à la glacière.

Nous avons enlevé le liquide surnageant au moyen du siphon d'Ambard. Le culot de centrifugation a été lavé à plusieurs reprises à l'eau distillée pour éliminer les matières minérales. Nous n'avons pas aspiré la totalité du liquide de peur d'entraîner les germes du fond. Le culot de centrifugation, recouvert d'une mince couche de liquide, a été porté à l'étuve à 100-110° et desséché à poids constant.

Cette méthode nous a permis de constater que la méthode par numération de colonies ne se prête pas toujours à la mesure. Les cultures d'un Staphylococcus aureus sur milieu témoin et sur milieu à base de filtrat, 3 jours après l'ensemencement, indiquaient une prolifération excessive mais égale dans tous les milieux. Or, par la méthode décrite ci-dessus, nous avons eu les résultats suivants:

Poids de la masse bactérienne sur milieux à base de filtrat de	Asp. fumigatus ..	0,0025
	Schizos. hominis .	0,0041
	Mucor nigricans .	0,0074
	Mucor plumbeus .	0,0081
à base de bouillon glucosé filtré	Témoin	0,0065

La croissance sur milieux à base de Mucor plumbeus et de Mucor nigricans est donc nettement plus forte que sur milieu témoin tandis qu'une croissance plus faible que sur le milieu témoin a été remarquée pour les milieux à base d'Aspergillus fumigatus et de Schizosaccharomyces hominis.

Cette expérience a été reprise pour une autre souche de Staphylocoque doré et a donné les mêmes résultats.

Les méthodes de numération des germes par l'emploi de compte-globules spécialisés et le dosage pondéral après forte

centrifugation et lavages nous ont fourni des résultats sensiblement comparables. Nous donnons dans le tableau IV un exemple concernant Sarcina aurantiaca:

TABLEAU IV.

Milieux de foie de veau additionnés de	Nombre de bactéries comptées après			Récolte en poids après 3 jours de culture	
	1 heure	2 heures	5 heures	grammes	%
0,5 cc. de bouillon glucosé filtré (Témoin)	10	26	53	0,0034	41
0,5 cc. de filtrat d'Aspergillus fumigatus	13	30	82	0,0045	54,2
0,5 cc. de filtrat de Schizosaccharomyces hominis	26	45	124	0,0052	62,65
0,5 cc. de filtrat de Mucor nigricans	24	56	143	0,0079	95,2
0,5 cc. de filtrat de Mucor plumbeus	28	68	187	0,0083	100

Les deux méthodes nous ont montré que les facteurs activant la croissance de Sarcina aurantiaca produits par le Mucor plumbeus étaient les plus favorables.

La méthode par centrifugation et pesée du culot nous a fourni de très bons résultats. Elle pèche un peu par la lenteur et la délicatesse dans la pesée du dépôt, mais elle offre la garantie nécessaire d'une mesure exacte et précise.

En conclusion, nous dirons donc que les méthodes par pesée et par numération de germes sont les plus fondées en attendant qu'elles soient remplacées par des méthodes plus rapides et moins délicates.

Chapitre III.

RESULTATS OBTENUS ET CONSIDERATIONS GENERALES.

C'est à l'aide des méthodes que nous venons d'indiquer que nous sommes arrivés à déterminer l'influence des facteurs contenus dans les milieux ensemencés avec les quatre microorganismes étudiés.

Avant d'entrer dans des considérations générales sur ce facteur, nous groupons en trois tableaux les résultats de nos recherches. Afin d'avoir la certitude d'avoir bien opéré et afin de pouvoir contrôler les résultats, chaque expérience a été répétée à plusieurs reprises.

Ces résultats ne permettent plus de douter de la valeur des facteurs issus des cultures d'organismes inférieurs sur le métabolisme des bactéries. Remarquons surtout la présence de facteurs très actifs sur un grand nombre de bactéries, principalement dans les filtrats de Mucor nigricans et Mucor plumbeus.

Les facteurs stimulants obtenus à partir des cultures de ces deux microorganismes occasionnent une prolifération maxima sur presque tous les coccis: Sarcine dorée, Staphylocoque doré, Staphylocoque Masson, Entérocoque, Streptocoque hémolytique, Streptococcus viridans, Gonocoque. La seule exception est fournie par Sarcina flava pour laquelle la culture se montre plus luxuriante en présence de facteurs stimulants provenant de Schizosaccharomyces hominis.

TABLEAU V (Coccis)

Influence de filtrats de	Aspergillus fumigatus			Schizosaccharomyces hominis			Mucor nigricans			Mucor plumbeus			Témoin		
sur	Résultats obtenus par														
	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%
Sarcine dorée	82	0,0045	54,2	124	0,0052	62,65	143	0,0079	95,2	187	0,0083	100	53	0,0034	41
Sarcine jaune	137	0,0050	94,3	141	0,0053	100	106	0,0038	71,7	99	0,0037	69,8	57	0,0020	37,9
Staphylocoque Masson	66	0,0025	38,4	96	0,0042	64,6	113	0,0054	83	134	0,0065	100	73	0,0029	44,6
Staphylocoque doré	45	0,0026	32	76	0,0041	50,6	107	0,0074	91,3	129	0,0081	100	87	0,0065	80,2
Entérocoque	94	0,0048	60,7	112	0,0052	65,8	102	0,0051	64,5	137	0,0079	100	122	0,0064	81
Streptocoque hémolytique	54	0,0029	42	57	0,0037	53,6	99	0,0069	100	95	0,0057	82,6	74	0,0049	71
Streptocoque viridans	49	0,0027	49	65	0,0042	80	81	0,0051	92,7	89	0,0055	100	63	0,0042	80
Gonocoque	44	0,0028	40	54	0,0037	53,6	80	0,0052	75,3	82	0,0069	100	42	0,0029	42

TABLEAU VI (Mycobactéries)

Influence de filtrats de	Aspergillus fumigatus			Schizosaccharomyces hominis			Mucor nigricans			Mucor plumbeus			Témoin		
sur	Résultats obtenus par														
	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%
Bacille de Loeffler	63	0,0047	77	59	0,0044	72,1	90	0,0058	95	91	0,0059	96,7	91	0,0061	100
Bacille pseudo-diphtérique	87	0,0057	72,1	89	0,0062	78,4	112	0,0070	88,6	97	0,0064	81	155	0,0079	100
Grasbacillus de Moeller	287	0,0114	100	168	0,0092	80,7	179	0,0093	81,5	192	0,0098	85,9	155	0,0087	76,3
Bacille de Koch (Vallée)	35	0,0028	100	12	0,0016	57,1	24	0,0018	64,2	16	0,0018	64,2	19	0,0018	64,2

TABLEAU VII (Groupe Coli-Typhiques et autres bactéries)

Influence de filtrats de	Aspergillus fumigatus			Schizosaccharomyces hominis			Mucor nigricans			Mucor plumbeus			Témoin		
sur	Résultats obtenus par														
	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%	Numération	Pesée	%
Colibacille	180	0,0081	75	237	0,0108	100	144	0,0065	60,1	132	0,0068	62,9	155	0,0072	66,6
Paratyphique A	145	0,0078	93,9	165	0,0083	100	127	0,0072	86,7	148	0,0070	84,3	132	0,0065	78,3
Paratyphique B	152	0,0081	84,2	194	0,0096	100	145	0,0078	81,2	110	0,0069	71,8	116	0,0061	63,5
Pneumobacille de Friedlander	58	0,0044	70,9	110	0,0062	100	104	0,0054	87	82	0,0053	85,4	52	0,0038	61,2
Bacille pycyanique	66	0,0058	85,2	87	0,0068	100	56	0,0045	66,1	48	0,0038	55,8	58	0,0036	52,9
Bacille prodigiosus	87	0,0047	54	190	0,0087	100	124	0,0056	64,3	148	0,0076	87,3	68	0,0039	44,8
Proteus vulgaris	115	0,0050	39,6	216	0,0126	100	182	0,0091	72,2	175	0,0089	70,6	142	0,0063	50
Bacillus subtilis	110	0,0077	88,7	96	0,0071	81,6	107	0,0074	85	116	0,0086	98,8	119	0,0087	100

Les filtrats obtenus à partir des cultures d'Aspergillus fumigatus Fresenius activent la croissance de toutes les bactéries du groupe Mycobacterium de Lehmann et Neumann que nous avons expérimentées: Bacille de Koch, type humain et bovin (Vallée), Grasbacillus de Moeller. Exceptions: le Bacille de la diphtérie et le bacille de Hoffmann pour lesquels nous n'avons pas pu mettre en évidence la moindre activation au moyen de nos quatre filtrats.

Les filtrats activants issus des cultures de Schizosaccharomyces hominis exercent leurs effets sur le Pneumobacille de Friedlaender, le Colibacille, le Paratyphique A et B, le Bacille pyocyanique, le Bacillus prodigiosus et le Proteus vulgaris.

Les divers filtrats expérimentés sont restés sans action sur le Bacillus subtilis, le Bacille du charbon, le Bacillus mesentericus et le Bacillus lacticus.

Nous avons été tentés d'examiner si les filtrats considérés n'avaient pas d'action sur la morphologie des bacilles. Un examen d'un frottis d'une culture de bacille diphtérique âgée de 3 jours nous a permis de faire les constatations suivantes:

Sur milieu témoin les bacilles diphtériques se composent de nombreux éléments courts, petits et Gram négatifs, sans formes d'involution.

Sur milieu à base de filtrats, au contraire, nous observons les variétés moyenne et petite, à éléments plus gros, à formes d'involution (massues, navettes), mais pas d'éléments Gram négatifs.

Il importe pour bien voir les divers éléments de ne pas trop longtemps décolorer par l'alcool-acétone. Nous indiquons notre technique de coloration:

a) verser sur la préparation la quantité de violet de gentiane nécessaire pour couvrir complètement, laisser agir 30 secondes;

b) rejeter l'excès de colorant sans laver, ajouter quelques gouttes de liquide de Lugol, laisser en contact 30 secondes;

c) laver à l'eau et verser sur la lame une couche de mélange alcool-acétone à raison de 95 cmc d'alcool à 95° pour 5 cmc d'acétone, laisser 5 secondes, rejeter l'excès et recommencer une deuxième fois;
d) laver de la même manière pendant 30 secondes avec mélange

alcool à 95°	4 p.
acétone	1 p.

e) contre-colorer avec éosine.

Au cours de toutes ces recherches, nous avons pu constater que les substances stimulantes engendrées par nos quatre champignons étaient strictement spécifiques pour certaines bactéries. Il ne peut donc s'agir d'une même et unique substance, mais chaque champignon doit produire son facteur activant agissant électivement sur telle bactérie.

Nous avons remarqué en outre que ce facteur activant accélère la vitesse de prolifération des bactéries sans augmenter le poids final récolté, c'est-à-dire qu'il ne stimule la croissance bactérienne qu'au début de l'évolution. La culture témoin au bout d'un certain temps rattrape l'avance acquise par les bactéries qui ont poussé sur les milieux à base de filtrats.

Aussi étrange que puisse paraître ce fait, aussi riches sont les explications que l'on peut donner.

La croissance des bactéries ensemencées dépend d'un côté de leur force énergétique et vitale, et de l'autre des conditions quantitatives et qualitatives du milieu. Si toutes les circonstances ont été choisies de façon telle que l'évolution s'effectue dans les meilleures conditions possibles, la croissance maxima se manifeste au début de la culture et ceci, par une accélération initiale. Car, en même temps que certains germes se multiplient, d'autres dépérissent et la dégénérescence est d'autant plus active que la croissance elle-même était intense.

On pourrait aussi supposer que les bactéries soient capables de synthétiser un facteur de croissance idiogène ou qu'elles n'en aient pas besoin en temps ordinaire. Si nous admettons la première hypothèse, on peut comprendre ainsi

que l'action du facteur stimulant hétérogène disparaisse bientôt et notamment dès que le pouvoir générateur propre des bactéries ensemencées devient manifeste. Dans le deuxième cas il faudrait croire à une action vitale initiale, non spécifique, qui disparaîtrait bientôt à la suite de la formation de produits de désassimilation dans le milieu.

Enfin on pourrait comparer ce fait à un autre un peu analogue, mais relevant du domaine de la physiologie animale. On sait, en effet, que les facteurs alimentaires accessoires nécessaires aux organismes supérieurs, ne jouent leur rôle activant que durant l'évolution de l'être et que l'organe qui a atteint son entier développement dispose d'une réserve suffisante pour pouvoir se dispenser pendant quelque temps de l'apport de nouvelles substances. Pourquoi n'en serait-il pas de même pour les bactéries?

Les facteurs activants sont solubles dans l'eau, traversent l'ultra-filtre et sont thermostabiles. Tous nos filtrats ont été chauffés avant usage pendant 20 minutes à 120°. Nous avons constaté que ce chauffage ne détruit et n'affaiblit même pas la substance, bien au contraire, il semble même que ce chauffage soit nécessaire. Nous sommes de l'avis de Goy qui suppose que la chaleur agit sur la nature chimique du composé.

Considérations générales.

Mais de quelle nature chimique est ce composé? Sommes-nous en présence d'une véritable vitamine?

Nous ne le pensons pas, quoique la parallélisme soit souvent frappant. Habituellement on entend par vitamines des corps relativement fragiles vis-à-vis de certaines températures, or, notre facteur est très résistant à la chaleur. D'ailleurs le fait même que les bactéries n'ont pas strictement besoin de tels composés, les place déjà sur un terrain particulier.

Même en pensant à l'existence de quelques vitamines résistant à certaines températures, nous n'avons jamais vu se former une vitamine sous l'influence de la chaleur. Or, nous avons remarqué que ces facteurs ne deviennent activants que par chauffage.

Cette résistance à la chaleur ne nous permet pas plus de croire à la présence d'un ferment.

L'action de ces facteurs à dose infinitésimale est surprenante et le fait qu'une quantité plus grande n'a pas de meilleure action sur la croissance, nous empêche de lui accorder une action nutritive.

Nous avons pensé, en effet, un moment que l'influence qu'exercent ces substances pouvait être due à des produits résultant de la dégradation des champignons, mais cette hypothèse a été vite abandonnée. Ces facteurs existent déjà dans des cultures très jeunes de champignons, deuxième fait qui infirme encore cette hypothèse.

Schopfer (67) a observé que Phycomyces blakesleeanus, cultivé sur milieu liquide contenant la vitamine B indispensable, synthétise un facteur différent de celle-ci. Il pense que ce dernier serait l'équivalent d'une hormone régulatrice de développement.

Cette substance agit sur le métabolisme de Phycomyces et active la multiplication de la levure proportionellement à la quantité d'extrait adjointe (effet «bios»).

Nous attribuerons donc à ces corps plutôt une action catalytique que nutritive et nous ferons entrer ces produits dans le groupe des «facteurs accessoires de croissance» de Sergent (68). Cet auteur leur attribue les caractères suivants:

«Substances de nature organique indéterminée, ne pouvant pas être remplacées par des composés chimiquement définis, agissant à doses infimes, à la manière de catalyseurs sur le métabolisme et ne constituant pas elles-mêmes des aliments».

L'objection que l'on pourrait nous faire à la suite des travaux de Nielsen et Hartelius (69) est vite rejetée.

Ces auteurs ont trouvé, en effet, que par voie chimique, il pouvait se former un facteur de croissance quand diverses espèces de sucres et différents acides organiques ou leurs sels ammoniacaux étaient chauffés en présence de papier-filtre.

Ce dernier ne serait pas strictement nécessaire à l'élaboration même du facteur, mais indispensable à son action sur les microorganismes. D'où le nom de «co-facteur» qu'on lui a donné. Dans un travail ultérieur, ces auteurs attribuent cette action à la présence de divers métaux dans le papier-filtre.

Or, l'action stimulante que nous avons observée ne peut être due au passage à travers les filtres. Toutes nos solutions ont été filtrées, aussi bien les cultures des champignons que le bouillon glucosé (témoin). Ensuite les filtrats à travers ultra-filtre, nous ont donné à peu près les mêmes résultats.

En ce qui concerne l'origine de ces facteurs de croissance, Legroux (70) avait fait l'hypothèse suivante: il pense que ces facteurs sont contenus dans les milieux habituels, mais sous une forme ou dans des combinaisons qui ne leur permettent pas d'agir. L'apport de certains produits aurait pour conséquence la formation de combinaisons nouvelles qui libèrent les facteurs de croissance et les rendent utilisables.

Ceci expliquerait la croissance initiale observée.

Dans un travail récent Van Saceghem (71) dit que le microbe n'est pas l'agent initial de la maladie, mais que l'état du terrain seul permet une action provocatrice, qu'il existe en somme une espèce de pro-virus. Nous avons pensé à la possibilité de la présence de facteurs analogues, qui seraient élaborés dans les cultures d'organismes inférieurs et qui, transplantés sur un nouveau milieu, agiraient sur la croissance des bactéries.

L'auteur envisage ceci au point de vue virulence, nous, au point de vue énergie vitale.

Mais ce sont là des hypothèses, que seulement des travaux expérimentaux ultérieurs pourraient élucider.

CONCLUSIONS

1° Nous avons au cours de notre travail pu mettre en évidence la présence de facteurs de croissance dans les cultures des organismes inférieurs suivants:

ASPERGILLUS FUMIGATUS FRESENIUS,
SCHIZOSACCHAROMYCES HOMINIS BENEDEK
MUCOR NIGRICANS VAN TIEGHEM
MUCOR PLUMBEUS BONORDEN.

L'influence de ces facteurs a été étudiée indirectement au moyen de filtrats et d'ultra-filtrats issus des cultures de ces champignons. Les résultats obtenus sont les mêmes dans les deux cas.

2° Après avoir observé cette action stimulante des divers filtrats, nous avons recherché une méthode pour mesurer leur influence et nous avons indiqué un milieu de choix pour réaliser les conditions les meilleures à la mesure. Diverses méthodes ont été examinées et une technique rigoureuse a été mise au point, notamment la pesée du culot de centrifugation des cultures bactériennes à base de filtrats.

Nous avons pu constater que la numération de colonies sur milieux solides constituait une méthode peu précise par comparaison avec les autres techniques mises en œuvre. Elle nous a permis toutefois de mettre en évidence que les facteurs activants ne déterminent qu'un amorçage rapide de cultures accélérant la vitesse de prolifération des bacilles sans augmenter le poids final de la récolte.

Les méthodes de numération des germes et le dosage pondéral après forte centrifugation et lavages nous ont fourni des résultats sensiblement comparables.

Nous insistons sur le fait indispensable à effectuer les cultures aux températures constantes indiquées et à suivre strictement la technique de dosage afin d'obtenir des résultats toujours comparables et toujours exacts.

3° Nous avons ainsi pu mettre en évidence les affinités suivantes pour quatre catégories de filtrats cryptogamiques sur trois groupes de bactéries:

Les facteurs stimulants contenus dans les filtrats de Mucor plumbeus ou de Mucor nigricans donnent une prolifération maxima des coccis suivants: Sarcine dorée, Staphylocoque doré, Staphylocoque Masson, Entérocoques, Streptocoque hémolytique, Streptocoque viridans, Gonocoque. Une exception cependant: Sarcina flava, qui offre une culture plus luxuriante en présence de facteurs activants provenant de Schizosaccharomyces hominis.

Les facteurs stimulants obtenus à partir des cultures d'Aspergillus fumigatus provoquent une croissance maxima de toutes les bactéries du groupe Mycobacterium de Lehmann et Neumann, examinées par nous: Bacille de Koch, type humain et bovin (Vallée), Grasbacillus de Mœller. Exceptions Bacille de Hoffmann et Bacille diphtérique pour lesquelles les filtrats n'ont eu aucune influence.

Les facteurs stimulants provenant des cultures de Schizosaccharomyces hominis agissent sur le Colibacille, le Paratyphique A et B, le Bacille de Friedlænder, le Bacille pyocyanique, le Bacille prodigiosus, le Proteus vulgaris.

Les divers filtrats sont inactifs sur le Bacillus subtilis, le Bacille du charbon, le Bacillus mesentericus et le Bacillus lacticus.

4° Nos recherches ont abouti aux résultats suivants:

a) présence d'un principe actif dans les cultures de champignons inférieurs, principe figurant déjà dans des cultures très jeunes. Les Mucors semblent plus aptes à l'élaborer que les autres micro-organismes;

b) nécessité d'un chauffage à 80° au moins pour rendre ce principe actif;

c) grande résistance à la chaleur;

d) action à doses minimes;

e) amorçage rapide des cultures, mais la présence de ce facteur n'est pas indispensable à la croissance des bactéries;

f) spécificité entre certains champignons et certaines bactéries;
g) quelquefois légères transformations morphologiques des bactéries soumises à ces filtrats (ex. bacille diphtérique).

5° Nous ignorons la nature de ce composé actif et son mode d'action. Toutefois nous pouvons affirmer qu'il n'a pas de rôle nutritif, nous croyons plutôt à une action catalytique.

6° Ces filtrats présentent de nombreux avantages:

Ils permettent de préparer facilement des milieux de culture à un prix de revient relativement faible et à transparence parfaite. Leur conservation possible à la glacière pendant plusieurs mois, sans perdre aucune propriété, n'est pas la moindre qualité.

Les cultures obtenues ont en général une plus grande vitalité et sont propices à la croissance rapide de certaines bactéries dont la culture en temps ordinaire est difficile (ex. Streptocoque).

Pour toutes ces raisons, mais surtout pour la constance et la supériorité des résultats qu'ils fournissent, les milieux à base d'extraits cryptogamiques méritent un emploi plus étendu dans la culture des bactéries.

NOTES BIBLIOGRAPHIQUES

(17) ABT et BLANC: Culture des microbes sur milieux à la levure. C. R. Soc. Biol. 1921, p. 452.

(62) ARON: Handbuch d. Bioch. 2. Aufl. 1923.

(13) AYERS et RUPP: Extracts of pure dry yeast for culture medium. Journ. of Bact. t. 5 1920, p. 29.

(1) BEIJERINCK: Zentralblatt für Bakt. t. 9 1890, p. 782.

(4) BERTRAND: Etudes biologiques sur la bactérie du sorbose. Ann. Ch. Phys. t. 3 1904, p. 121.

(45) BORREL-BOEZ et de COULON: Facteurs accessoires de la croissance du bacille tuberculeux. C. R. Soc. Biol. t. 89 1923, p. 191.

(39) BOTTOMLEY: Some accessory factors in plant growth nutrition. Proceed of the roy. Soc. t. 88 1914, p. 237.

(32) CANTANI: Zentralblatt f. Bakt. Refer. t. 28 1900, p. 743.

(43) DAVIS: Food. accessory factors in bacter. cult. J. of. inf. dis. 1917 — 1918 — 1921.

(65) DICHTL: Arch. f. Hygiene, t. 89 1920, p. 47.

(10) DIENERT-GUILLERD: Milieu à l'eau de levure autolysée pour la culture du bacille de Coli. C. R. Ac. Sc. t. 168 1919, p. 256.

(29) DUCLAUX: Traité de Microbiologie — Masson.

(11) EBERSON: Yeast mycelium for prolonging the viability of the meningococcus. Journ amer. med. assoc. t. 72 1919, p. 852.

(5) FISCHER-BITTER-WAGNER: Münch. mediz. Wochenschr. 1915, p. 772.

(21) FREEDMANN-FUNK: Proceed. of. Soc. f. exp. Biol. a. Med. t. 19 1921, p. 198.

(61) FUNK: Die Vitamine, ihre Bedeutung f. Physiol. u. Pathol. 2. Aufl. 1922.

(18) FUNK-DUBIN: Vitamines requirements of cert. yeasts and bacteria J. biol. chem. t. 48 1921, p. 437.

(7) GASSNER: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I. t. 79 1917, p. 308.

(33) GHON-PREYZ: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I, t. 32 1902, p. 90.

(49) GISCARD: Thèse Médecine 1923.

(56) GOY: Fact. accessoires de la croissance chez les végétaux inf. Thèse Paris sciences 1920-21.
— Végétaux inf. et fact. accessoires. C. R. Ac. Sc. t. 172 1921, page 242.
— Physiologie microbienne et fact. access. de croissance. C. R. Ac. Sc. 1922, p. 1579.
— Action de filtrat de Mucor sur le dévelopg. des cultures microb. C. R. Soc. Biol. t. 82, 1922.

(63) GRALKA: Jahrbuch f. Kinderheilk. t. 100, 1923, p. 267.

(31) GRASSBERGER: Zeitschrift f. Hyg. t. 25 1897, p. 453.

(46) HARTOCH-JOFFE: Arb. Staatsinst. exp. Ther. Frankfurt t. 21 1928, p. 83.

(20) JIMENEZ: Vitamines dans les milieux de cultures. Siglo. Med. t. 68 1921, p. 310.

(12) JOETTEN: Arb. Reichsges. t. 52 1920, p. 339.

(55) KIRCHNER: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I t. 118 1930, p. 172.

(19) KISTER: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I t. 87 1921-22.

(9) KLIGER: Yeast autolysate as a cult. medium f. bact. J. of Bact. t. 4 1919, p. 183.

(35) KNORR: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I. t. 92 1924, p. 371, t. 94 1925, p. 392.

(36) KOLLATH: Vitaminähnliche Substanzen in ihrer Wirkung auf das Wachstum der Influenzabazillen. Zentralblatt Orig. I t. 93 1924, p. 506, t. 95 1925, p. 158 et 279, t. 100 1926, p. 96. Klinische Wochenschr. t. 5 N° 21 1926, p. 930.

(6) KRESSLER: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I t. 80, 1917.

(68) LEGROUX: Vitam. pour la cult. des bact. C. R. Ac. sc. 1920.

(66) LEICHTENTRITT-ZIELAKOWSKI: Monatschr. f. Kinderheil. t. 26 1923, page 232.

(23) LICHTENSTEIN: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I t. 90, 1923.

(37) LUERSSEN: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I t. 42 1904, page 1.

(52) MACHADO: C. R. Soc. Biol. t. 96 1927, p. 484.

(54) MILOCHEVITSCH: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I t. 118 1930, p. 170.

(40) MOCKERIDGE: Proc. R. Soc. Série B t. 89 1917, p. 508.

(60) MONAL: Thèse Strasbourg 1933.

(14) MORINI: Culture du gonocoque dans la gélatine à la levure de bière. Rif. med. Napoli t. 36 1920, p. 2.

(24) MURRAY: Food. accessory substances and the nitrite bacteria. Proc. of the Soc. f. exp. Biol. a. Med. t. 20 1923, p. 301.

(34) NEISSER: Deutsche Med. Wochenschr. t. 29 1903, p 462.

(27) NELL, JAMES, SUGG, RICHARDSON, LURLINE: J. Bacter. 1929 t. 17, p. 329; Zentralblatt Ref. t. 95, page 474.

(69) NIELSEN-HARTELIUS. Bioch. Zeit. 1932, 1933, 1935 t. 256, 259 und 276.

(3) NOBECOURT: Action des levures sur les microbes. C. R. Soc. Biol. 1900, p. 753 et 755.

(47) OLITZKI: Zentralbl. f. Bakt. Orig. I t. 119, p. 223 1930, t. 113, p. 395, 1929.

(30) PACINI-RUSSEL: Journ. of biol. Chem. t. 34, 1918.

(48) PALGEN: Trav. du lab. de Microbiol. de Nancy, 1935.

(51) RAPPIN: Vie médicale 1924.

(64) ROSENTAL: Berl. klin. Wochenschr. 1913.

(59) A. R. SARTORY-MEYER: C. R. Ac. Méd. juillet 1935.

(16) SAZERAC: Culture du bacille tuberc. s. milieu à base de levure autolysée. C. R. Ac. Sc. t. 171 1920, p. 278.

(67) SCHOPFER: C. R. Ac. Sc. 1934-1936 t. 199, 202.

(68) SERGENT A. L.: Facteur de croissance des microbes. Thèse Paris Méd. 1928.

(2) SPRONK: Ann. I. Past. t. 12 1898, p. 701.

(53) SWEANY: Amer. Rev. tuberc. t. 17 1928, p. 53.

(57) TEMPE: Thèse Strasbourg, méd. 1926.

(22) THILO-KURT: Deutsche Med. Woch. 1922, p. 868; Zentralbl. Refer. t. 74 1922-23, p. 567.

(44) TJOETTA: J. of. exper. Med. t. 33 1921, p. 763.

(15) TJOETTA AVERY: J. of. exper. Med. t. 34 1921, p. 97.

(41) TJOETTA AVERY: Growth access. substances in the nutrition of bact. Proceed Soc. for exper. Biol. a. Med. t. 18 1921, p. 197.

(38) TWORT et INGRAM: Proc. Roy. Soc. t. 84 1912; The veter. Record N° 1262, 1912, p. 141.

(26) UYEI NAO: Nature of growth promoting active principle in protato in cultivation of bacteria and especially of tubercle bacillus. Am. Rev. Tuberc. t. 22, p. 203, 1930.

(71) VAN SACEGHEM: Revue de path. comp. mai 1936, page 561.

(8) VANSTEENBERG: Ann. I. Pasteur 1917 t. 31, p. 601.

(50) VAUDREMER: C. R. Soc. Biol. 1913, p. 278. Communications à la Soc. de Méd. et de Pharm. Toulouse par le Docteur Parcé. Gazette Médicale de France. C. R. Soc. Biol. t. 94 1926, p. 120.

(58) VAUDREMER et Mlle BRUN: Culture du bac. de Hansen. Bulletin Ac. Méd. juin 1935.

(42) WEICHARDT: Deut. Med. Wochenschr. t. 53 1927, p. 1545.

(25) WYON: J. of. Path. and. bact. t. 24 1923, p. 441.

(28) WYSS: Cond. biol. de la culture du gonocoque. Schw. Med. Woch. 1934, p. 854.

Vu,
Strasbourg, le 25 octobre 1936.
Le Président du Jury:
A. SARTORY.

Vu et approuvé,
Strasbourg, le 26 octobre 1936.
Le Doyen de la Faculté
de Parmacie:
A. SARTORY.

Vu et permis d'imprimer,
Strasbourg, le 27 octobre 1936.
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université:
J. DRESCH.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 9

Première Partie

HISTORIQUE

Chapitre I: Influence des extraits de levure sur la croissance des bactéries 15

Chapitre II: Influence des extraits de bactéries sur leur propre croissance 23

Chapitre III: Influence de filtrats de champignons inférieurs sur la croissance des bactéries 31

Deuxième Partie

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre I: Préparation des filtrats de champignons 39

Chapitre II: Techniques et méthodes de mesure employées pour mesurer l'influence des filtrats de champignons 49

Chapitre III: Résultats obtenus et considérations générales 59

Conclusions 69

Notes bibliographiques 73